

# CE/MS の原理と実際

ガイドブック





# CE/MS の原理と実際

ガイドブック



# 目次

<b>1</b>	<b>本書の目的</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>まえがき</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>著者の紹介</b>	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>謝辞</b>	<b>11</b>
<b>5</b>	<b>記号と略語</b>	<b>12</b>
	<b>パート 1: CE/MS の概念</b>	<b>13</b>
<b>6</b>	<b>液相分離と質量分析の接続</b>	<b>14</b>
6.1	CE/MS 接続の要件	15
6.2	同軸シース液流の概念	17
6.3	三重管構造のスプレーヤー	18
<b>7</b>	<b>アジレントCE/MS システム</b>	<b>20</b>
7.1	システムの概要	20
7.2	システムの詳細	20
<b>8</b>	<b>CE/MS 分析システムに最適なパラメータ</b>	<b>22</b>
<b>9</b>	<b>CE の分離メソッドとパラメータの選択</b>	<b>23</b>
9.1	CE の分離モード	23
9.2	BGE の組成	23
9.3	分離キャピラリー	25
9.4	電場と極性	28
9.5	サンプル導入方法	30
9.6	CE/MS インタフェース – イオンソース	33
9.7	イオン化の種類 – ESI、APCI、APPI	33
9.8	シース液の組成と送液	34
9.9	分析パラメータ – ネブライザガス圧、ドライガス温度、流量	37
9.10	エレクトロスプレーイオン化電圧	38

<b>パート 2: CE/MS の実際</b>	<b>39</b>
<b>10 CE/MS の実際</b>	<b>40</b>
<b>11 Agilent CE/MS システムの一般的な設定</b>	<b>42</b>
11.1 CE および MS 機器の高さ調整	42
11.2 7100 CE 装置と CE/MS 接続の準備	43
11.3 7100 CE 装置背面パネルの接続	44
<b>12 Agilent OpenLab CDS (ChemStation Edition) ソフトウェアによる Agilent CE/MS システムの設定</b>	<b>46</b>
12.1 Agilent CE/MS ChemStation ソフトウェア アドオンモジュールのインストール	46
12.2 1260 Infinity II アイソクラティックポンプの設定	47
12.3 MS の構成	49
12.4 グラフィカルユーザーインターフェースの説明	50
12.5 CE モードの設定	51
<b>13 Agilent MassHunter ソフトウェアによる Agilent CE/MS システムの設定</b>	<b>52</b>
<b>14 キャピラリーおよび CE/MS カセットの取り付け</b>	<b>55</b>
14.1 キャピラリーの準備	55
14.2 CE/MS カセットへのキャピラリーの取り付け	58
<b>15 Agilent 1260 Infinity II のポンプおよび真空デガッサの準備</b>	<b>60</b>
15.1 シース液送液チューブの接続	60
15.2 ポンプパラメータの設定	60
<b>16 三重管構造のスプレーヤーの取り付け</b>	<b>62</b>
16.1 CE/MS のイオンソース	62
16.2 CE/ESI-MS スプレーヤーと CE キャピラリーの接続と調整	63
16.3 CE/ESI-MS スプレーヤーの取り付け	64
16.4 CE キャピラリーのコンディショニング	64
16.5 CE 電流の確認	66
16.6 CE/MS チェックアウトメソッド	67
16.7 使用後の CE/MS キャピラリー、シースフロースプリッタ、 および CE/MSD スプレーニードルの保管	69

<b>17 DAD を用いた CE/MS 分析メソッドの設定</b>	<b>70</b>
17.1 CE/MS メソッドの設定	70
17.2 CE/MS メソッドの MS 部の設定	72
17.3 DAD を使用しない CE/MS 分析メソッドの設定	73
17.4 コントロール図からの DAD の削除	74
17.5 グラフィカルユーザーインターフェースの説明	75
<b>18 CE/MSメソッドとアプリケーション</b>	<b>77</b>
18.1 陽イオン CE/MS 分析のメソッド	77
18.2 陰イオン CE/MS 分析mpメソッド	80
<b>19 メンテナンス</b>	<b>84</b>
19.1 CE/MS キャピラリー、シースフロープリッタ、 および CE/MS スプレーニードルの保管	84
<b>20 トラブルシューティング</b>	<b>86</b>
20.1 CE 電流に関連する症状	86
20.2 MS シグナルに関連する症状	87
20.3 症状 - ESI 電流	89
<b>21 メソッド開発に関する詳細情報</b>	<b>90</b>
21.1 吸引効果の測定と低減	90
21.2 シース液の組成の影響	92
<b>22 関連情報</b>	<b>93</b>
22.1 CE/MS スプレーヤーキットの組み立て	93
22.2 スプレーヤーのメンテナンス	95
22.3 バッファとテストサンプルの調製	97
<b>23 参考文献</b>	<b>99</b>

# 1 本書の目的

1990年代に機器分析法の1つとして確立されて以来、キャピラリー電気泳動法(CE)は荷電化合物の主要な分離手段として進化してきました。現在、CEは、低分子量(LMW)医薬品(特にエナンチオマーの分離)をはじめとする生物学的関連性の高い多くのLMW分子の分析や、イオン分析に活用されています。また、構造均一性、サイズおよび電荷不均一性、特に内因性タンパク質や遺伝子組み換えタンパク質のグリコシル化パターンの測定になくならないツールとなっています。CEが優れた分離能と感度を兼ね備えていること、また必要なサンプル量がわずかであることが、その大きな要因です。

液体クロマトグラフィー(LC)とエレクトロスプレーイオン化質量分析法(MS)を連結させた分析法が1980年代末に登場し、新薬の開発においてきわめて重要な役割を果たしてきました。ライフサイエンス研究では、LCとMS検出の組み合わせによって収集される有益な構造情報をもとに、ペプチドおよびタンパク質の同定、構造、および異種性を明確に確認できるようになりました。

LC/MSの確立から間もない1980年代末に、CEとMSを連結した成功事例が報告されるようになったのも、当然の成り行きと言えるでしょう。その後、1999年にアジレント・テクノロジー(当時ヒューレット・パッカード)からCE/MSインタフェースが発売され、この分析法が製品化されました。以来、生体分析測定において、その幅広い多用途性と実用性が実証されてきました。

いまや、キャピラリー電気泳動と質量分析を連結させた分析法(CE/MS)は、バイオ医薬品の開発、特性解析、製造や、バイオマーカー探索に不可欠なツールとなるまでに発展しています。現在、医薬品業界で開発中の新薬の35~50%は、タンパク質またはタンパク質様分子です。こういったバイオ医薬品が規制当局の認可を得るためには、低分子医薬品よりも広範な生体分析を実施し、品質、安全性、有効性を検証する必要があります。その一方で、第一世代のバイオ医薬品に対する知的所有権(IPR)の期間満了に伴い、バイオシミラー発売への動きも活発化しています。これらバイオシミラーを市販する際にも、先発品との同一性および構造的等価性を証明することが求められます。

さらに最近では、メタボロミクス分野においても、陽イオン性/陰イオン性および極性代謝物のスクリーニング手段としてCE/MSが注目を集めています。CE/MSは、標準的な分析法へと進化を遂げ、市販システムとして提供されるようになりました。

こうした動向が、CE/MS市場成長の大きな原動力となってきました。

とは言え、生体分析やライフサイエンス研究への普及が順調に進んだわけではありません。HPLCとは異なり、CEはエキスパートや専門家向けの分析法とみなされていたからです。CE分離の優れた再現性、堅牢性、感度の背後にある要因が十分に理解されるようになった現在、CEとCE/MSはいずれも、LC/MSを補完し、生体分子の構造および組成情報が得られる有力な分離法として認められています。

ただし、CE と MS との連結には、その接続に必要なインタフェースにおいて、LC/MS インタフェースとは別の「困難」が伴います。

初心者が CE/MS の実用へと一歩を踏み出す後押しをすること、また CE/MS の既存ユーザーにメソッド開発および実際の問題の診断に関する情報を提供することが、本書の目的です。本書では、以下の 2 部構成でこの目標を目指します。

#### **パート 1: CE/MS の概念**

重要ポイントを詳しく取り上げながら CE/MS の概念について説明します。この手法に関する理解を深め、適切な開始条件を選択できるようになります。

#### **パート 2: CE/MS の実際**

実際の使用方法をアジレントの推奨事項に沿って詳しく説明します。CE 機器、インタフェース、および MS の設定について理解できます。また、既存ユーザー向けに、メソッド開発および実際の問題の診断に関する情報を提供します。システムの性能評価を行うための詳細なガイドラインも掲載します。

## 2 まえがき



**Dr. Julie Schappler**  
スイス ジュネーブ大学薬学部元講師

キャピラリー電気泳動法 (CE) は、強力な分離法であると同時に、優れた分離効率、迅速なメソッド開発が可能、シンプルな機器、少ないサンプル使用量、低コストなど多くの利点を備えています。CE での検出手法には、オンキャピラリー構成というシンプルさから UV-Vis 分光光度計が最も広く使用されているようですが、検出感度はキャピラリーの内径に比例するため、高感度検出は若干難しくなります。特に生体分析の分野では、扱うサンプルが複雑なため、選択性の高い検出器が必要になります。このような状況で威力を発揮するのが、高い分離効率の CE に質量分析計をオンラインで接続するシステムです。実際、感度や選択性が向上するなど、大きな利点もたらされます。

CE/MS は、医薬品やバイオ医薬品の分析、生体分析など、メタボロミクス研究も含め、多くのアプリケーションに適した分析法ですが、その性能が不十分なものとして過小評価されることもあります。この誤解の大半は、トレーニングや専門知識が不足しているために正しく CE/MS を使用できていないことが原因です。安定した最適な CE/MS 分析を確保するためには、機器のさまざまな面、特にインタフェース条件に細心の注意を払う必要があります。ここ数年にわたり、インタフェースに関連する多くの技術的改善がなされ、高品質のデータ採取が行えるようになりました。CE と ESI-MS 検出を連結するための市販のシース液型インタフェースは、何年も前からその有効性が実証されています。このインタフェースの明らかな利点は、CE プロセスと ESI プロセスが互いに影響されないということです。つまり、標準的なキャピラリーを使用して幅広い泳動バッファで分析を行えるということです。この構成では、シース液の流量が一定に保たれることでスプレーヤーの安定性が高まり、優れた堅牢性が実現されます。複数の研究グループから発表された多くの定量分析結果には、この接続の潜在力が示されています。それは、CE/MS では定量的な結果が得られないという一般的な認識を覆すものであり、CE/MS の性能が他の分析法に決して劣らないことを実証するものです。

本書をお読みいただくことで、CE/MS の概念について、また最適な CE/MS 動作を確保するために考慮する必要のある実際的な事柄について、十分に理解できるものと思います。さらに、感度、信頼性、および再現性の高い結果を得るために、各自のアプリケーションや目的に応じて正しい実験パラメータを選択することの重要性とその方法を学ぶことができます。CE/MS により分析上の困難な課題にも対処できるようになること、CE/MS が現代の分離科学において重要な役割を果たしていることにも納得していただけるでしょう。

Julie Schappler



**Dr. Christian Neusüß 教授**  
ドイツ アーレン大学一般・分析化学教授

15年以上前に CE/MS が登場した当初は、キャピラリー電気泳動法の知識だけでなく、質量分析法自体の知識も必要でした。しかも、有意なメソッドや結果を得るためには、直感による実験と試行錯誤を何度も繰り返さなければならなかったため、日常的に CE/MS を使用している人はほんの一握りでした。ところが、幅広いアプリケーション分野において、CE の持つ選択性と MS の感度および情報量との組み合わせが強力なツールになることが判明し、いまや CE/MS は、食品管理やメタボロミクスなど多くの分野で活用されるようになってきました。特にバイオ医薬品分析では、インタクトタンパク質やグリカンの分析において、その真価が発揮されています。

CE/MS の実現は、その大部分がアジレントのシーズ液インタフェースのおかげであると言えるでしょう。このインタフェースは堅牢で使いやすく、CE/MS のセットアップをわずか数分で完了できます。また、ほぼ分離とは関係なくイオン化条件を柔軟に選択できるため、最適な ESI 条件の選択により、希釈効果を部分的に補正することも可能です。我々は、これまでさまざまなアプリケーションにこのインタフェースを使用してきましたが、現在では当ラボのルーチンツールとなっており、他の技術を評価する際の基準になっています。

本書は、増えつつある CE/MS ユーザーが、それぞれのアプリケーションに対してより高速なメソッドを見いだす助けとなるでしょう。科学出版物からは通常得られない重要かつ実用的なパラメータについても詳しく説明しており、CE/MS の理論と実用とのギャップを埋める内容となっています。本書の前半では、具体的な機器の操作には触れず、これから CE/MS を使用するユーザーにも経験のあるユーザーにも役立つ情報を提供しています。この情報は、マイクロチップ電気泳動または二次元キャピラリー電気泳動と質量分析との連結など、将来的な発展を支える基盤にもなります。

厳しい目を持つ多くの読者に、本書にまとめられた重要な CE/MS パラメータを活用いただくとともに、分析化学者の立場から徹底的に吟味し、まだ発達段階にあるこの技術のさらなる改善および普及へとつなげていただければ幸いです。

Christian Neusüß

### 3 著者の紹介

**Gerard Rozing** 氏は、1971年にオランダのアムステルダム大学で化学工学および有機化学の学部過程を修了しました。1977年前半に同大学で有機化学の博士号を取得した後、1978年初めまでベルギーの州立ゲント大学で NATO 科学的研究員として研究に取り組みました。その後、アムステルダム大学の Hans Poppe 教授率いる研究チームに加わり、クロマトグラフィーおよび分析化学の研究に従事しました。1979年にドイツ ヴァルトブロンンのヒューレット・パッカードに入社し、R&D 化学者として固定相の開発および HPLC システムの評価に携わり、R&D プロジェクトリーダー、後に R&D 部門マネージャーを歴任しました。2000年に University Relations and External Collaborations 部門のマネージャーに就任し、2012年9月1日に退職するまでこの役職を務めました。Rozing 氏は、2006年にアジレント・テクノロジーの化学分析グループ初のアジレント研究員となりました。2006年にアムステルダムで、また 2012年にジュネーブで開催された MicroScale Bioseparation シンポジウムでは議長を務めました。近年発行された一連の HPLC 論文集の編成にも携わり、Electrophoresis および Journal of Separation Science の編集顧問委員として活動してきました。現在は、ブリュッセル自由大学およびアムステルダム大学の客員研究員として、また ROZING.COM Consulting において液相分離化学の独立コンサルタントとして活躍しています。

**Hans Brunnert** および **Sibylle Aldridge** は、ドイツ ヴァルトブロンンのアジレント・テクノロジーのサポートスペシャリストです。キャピラリー電気泳動（およびマイクロ流体「Lab on a Chip」、HPLC、質量分析との連結などのその他の技術）に関する長年の経験を持ち、世界中のアジレントのサポート組織およびそのお客様に技術的観点から高度なサポートとコンサルティングを提供しています。

**Christian Wenz** は、ドイツ ヴァルトブロンンのアジレント・テクノロジーの R&D サイエントリストです。ドイツのハノーファー大学で生物化学を学んだ後、ドイツのユストゥスリービヒ大学ギーゼンの生物化学科で Alfred Pingoud 教授の研究チームの一員として核酸と相互作用するタンパク質の構造および機能に関する研究を行い、博士号を取得しました。スイス エバランジュの Swiss Institute for Experimental Cancer Research (ISREC) で研究員を務めた後、2002年にアジレント・テクノロジーに入社しました。過去 10 年間にわたり、Agilent 3100 OFFGEL Fractionator および Agilent 2100 バイオアナライザシステムをはじめ、自動電気泳動システムの機器およびアプリケーションの開発に従事してきました。2009年からは、Agilent 7100 キャピラリー電気泳動システムに関連する業務に取り組んでいます。この機器に関するアジレント・テクノロジー発行のアプリケーションノートおよび技術資料の著者でもあります。

## 4 謝辞

本書の執筆にあたり、見識や経験の共有を通して多くの同僚および研究者にご協力いただきました。特に、以下の方々に感謝を申し上げます。

Martin Greiner、アジレント・テクノロジー、ドイツ ヴァルトブロン

Sibylle Diehl、アジレント・テクノロジー、ドイツ ヴァルトブロン

Gordon Ross、アジレント・テクノロジー、英国マンチェスター チードル

Jos Lips、アジレント・テクノロジー、オランダ アムステルダム

Suresh Babu Cugati Vishweshwari、アジレント・テクノロジー、インド バンガロール

## 5 記号と略語

<b>APCI</b>	大気圧化学イオン化
<b>APPI</b>	大気圧光イオン化
<b>BGE</b>	バックグラウンド電解液
<b>CE</b>	キャピラリー電気泳動
<b>CE/MS</b>	キャピラリー電気泳動と質量分析の連結*
<b>CEC</b>	キャピラリー電気クロマトグラフィー
<b>CGE</b>	キャピラリーゲル電気泳動
<b>CIEF</b>	キャピラリー等電点電気泳動
<b>CITP</b>	キャピラリー等速電気泳動
<b>CZE</b>	キャピラリーゾーン電気泳動
<b>DAD</b>	ダイオードアレイ検出器
<b>EOF</b>	電気浸透流
<b>ESI</b>	エレクトロスプレーイオン化
<b>GC</b>	ガスクロマトグラフィー
<b>GC/MS</b>	ガスクロマトグラフィーと質量分析の連結*
<b>HMW</b>	高分子量
<b>HPLC</b>	高速液体クロマトグラフィー
<b>id</b>	内径
<b>IF</b>	インタフェース
<b>IPR</b>	知的所有権
<b>LC</b>	液体クロマトグラフィー
<b>LC/MS</b>	液体クロマトグラフィーと質量分析の連結*
<b>LMW</b>	低分子量
<b>MALDI</b>	マトリックス支援レーザー脱離イオン化
<b>MEKC</b>	ミセル動電クロマトグラフィー
<b>MEEKC</b>	マイクロエマルジョン動電クロマトグラフィー
<b>MS</b>	質量分析
<b>od</b>	外径
<b>SMIL</b>	連続的多重イオン性高分子層
<b>SPE</b>	固相抽出
<b>SST</b>	ステンレス
<b>UHPLC</b>	超高速液体クロマトグラフィー

\*分析手法の連結を表すハイフン (-) またはスラッシュ (/) の使用には明確な取り決めがありません。  
アジレント・テクノロジーでは、スラッシュを使用しています。  
詳細については、K.K. Murray, J. Chrom. A, 1217 (2010) 3922-3928 をご覧ください。

# パート 1 CE/MS の概念

本書の前半では、キャピラリー電気泳動による分離と質量分析による検出を組み合わせた分析法について詳しく説明します。この章では、最初に CE/MS の基本概念を説明し、続いてさまざまな種類のイオン化法について考察し、最後にパラメータに関する考慮事項を示します。

## 6 液相分離と質量分析の連結

1980年代初期に HPLC 技術が成熟してしばらくの間は、HPLC と質量分析を連結することが課題となりました。液相からガス相への分析成分の導入、そのイオン化、および超高真空部への分子イオンの移送は、ガス相分離 (GC) よりも液相分離 (LC) の方がはるかに困難です。1970年代以降、現場ではさまざまな LC/MS インタフェース手法が試行錯誤されました。例えば、カラムの溶出液を可動ベルトや可動ワイヤで真空部へ移送する方法、溶出液を注入口に直接導入する方法<sup>1</sup>、サーモスプレーイオン化法<sup>2</sup>、パーティクルビームイオン化法<sup>3</sup>、オフラインで MALDI プレートに連結する方法などが試されました。

1980年代末には、Fenn<sup>4</sup> および Alexandrov<sup>5</sup> により、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) が初めて報告されました。このアプローチでは、HPLC カラムの溶出液が細い開口部から吐出され、強力な電場に曝露されることで、微細液滴のスプレーが形成されます。この液滴は、蒸発によって最終的な荷電分子 (イオン) になり、インレットキャピラリーを通して質量分析計へ送られます。当初の大きな期待に反し、エレクトロスプレーイオン化法で安定したエレクトロスプレーを確保するためには、流量は最大 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、移動相は含水量の低いものに限られました。

ところが、1980年代当時、HPLC 分離に使用されていた多くのカラムは、含水量の多い移動相を使用する逆相タイプでした。また、内径が 2.1 ~ 4.6 mm であったため、標準的な流量は 0.2 ~ 2.0  $\text{mL}/\text{min}$  でした。Henion と同僚らは、この条件下で安定したスプレーを確保する手段としてインタフェースの概念を考案し、これを「イオンスプレー」イオン化法と名付けました<sup>6</sup>。スプレーの形成 (噴霧) を窒素ガスの同軸流によって補助するのが、このアプローチの特徴です。

このイオン化スプレーインタフェース技術は、時間をかけて改善が重ねられ、さらに製品化されたことで広く普及し、多くのユーザーが最大流量 1 ~ 2  $\text{mL}/\text{min}$  で利用できるようになりました。定義上は、イオンスプレーイオン化法と「エレクトロスプレー」イオン化法は同じものではありません。現在、エレクトロスプレーイオン化法と呼ばれているのは、20年以上にわたって LC/MS を連結する標準的な手法として用いられてきたイオンスプレーイオン化法です。

本来のエレクトロスプレーは、10  $\mu\text{L}/\text{min}$  よりはるかに低い流量で動作することから、現在はナノエレクトロスプレーイオン化法と呼ばれています。この技術は、多用途性および感度のきわめて高いインタフェース手法として、プロテオミクス、バイオマーカー探索、およびメタボロミクス分野で活用されています。その分析には、分析成分濃度の低い少量のサンプル (低  $\mu\text{L}$ ) が一般的に用いられています。低流量で分析を行うためには、低流量 (1  $\mu\text{L}/\text{min}$  未満) に対応した内径の小さな HPLC 分離カラム (150  $\mu\text{m}$  未満) を使用する必要があります。また、流量を 100  $\text{nL}/\text{min}$  未満にすると、MS 信号が大幅に改善し、同時にマトリックス効果 (イオン抑制) が低減することがわかっています。

## 6.1 CE/MS 連結の要件

1980年代中盤にCEが確立されて間もなく、CEとMSを連結させることに関心が向けられるようになりました。CEは定義上、超低流量の分離法であり、MSと連結することで、前述の利点を活かすことができます。その一方、CEとMSとの連結には、溶解した分析成分分子の液相からガス相への導入とそのイオン化に関連する問題として、その連結を困難にするCE分離に固有の要因が存在します。

### 電気接続

CEでは、電場をかけることで、溶質がキャピラリーの出口に向かって電気泳動で移動します。また、電場によって電気浸透流が生じると、BGEが同じ方向に流れます。通常は、BGE入りバイアル内のプラチナ/パラジウム電極を使用して注入口側に電圧を印加します（最大30 kV）。CEシステムでは、BGE入りの出口側バイアルには、同じ材質の接地電極が挿入されています。CEとMSを連結する場合は出口側バイアルを設置することができませんが、CE電流のリターン経路を設けるために、液体バイアルのような電気的接点が必要なことに変わりはありません。

一方、エレクトロスプレーを発生させるためには、CEキャピラリーの先端とMSの注入口との間に電場が必要なため、高電圧（最大4 kV）が印加されます。すなわち、エレクトロスプレーにも、正または負電圧側に1つ、接地側に1つ、合計2つの電極が必要です。

ここで、2つの電場の接地電極を共有できればよいということがわかります。その場合、CEとエレクトロスプレーの電源は共通の電流リターン経路を持つことになります。CEとエレクトロスプレーの電流は接地側へと同じ方向に流れ、干渉しあうことはありません。

実際には、CEとMSがキャピラリーの出口で電気的な接地接点を共有し、MSのインレットキャピラリーでエレクトロスプレー電圧が印加されます。さらに補足すると、これらのMS機器のインレットキャピラリーはガラス製チューブであり、エレクトロスプレー電圧が絶縁されるため、MSの真空部に影響がおよぶことはありません。

この他、スプレーニードルを通してCEのキャピラリー先端からエレクトロスプレー電圧を印加し、質量分析計の注入口で接地する方法も考えられます。この場合、エレクトロスプレー電圧が逆の電荷になるという奇妙な状況が生じる可能性があります。また、CE電圧と同じ符号にすると、必然的にCEキャピラリー内の電場が減少または増加することになります。

CEの分離キャピラリー内の電解液に流れる電流は、エレクトロスプレーの100～1000倍になる可能性があります。その場合、CE電流がMS注入口内にある接地部に向かって流れ、MSを損傷するおそれがあります。このような損傷を防ぐために、CE電流を別経路で低減させる電気抵抗回路を追加する必要があります。その詳細な説明はここでは省略しますが、他のMS機器サプライヤーからも入手が可能な場合があります。

## 流体力学

HPLCとは異なり、CEにおける流速、すなわち電気浸透流（EOF）は、BGEの特性、フューズドシリカキャピラリー壁面の電荷などの要因によって決まるパラメータです。ただし、EOFは、HPLCのように体積流量をコントロールするために設定できるパラメータではありません。理想条件下では、BGEは1～3 mm/sの速度でキャピラリー内を移動します。内径50 μmキャピラリーの場合、これは0.12～0.35 μL/minに相当します。ただし、CE分離に最適なBGEの組成では、実際のEOFがこれより低いか、0になるか、逆方向になることもあります。後ほど説明しますが、CE/MSに使用されるスプレーヤーは、比較的高い流量用に開発されています。そのため、補助的な溶媒流によってスプレーの形成を補助することが必要になります。

## CE分離法に悪影響をおよぼす要素

CE分離では、BGEとして無機緩衝液を使用することが推奨されますが、特別な選択性を得るために、BGEに添加物を加えることができます（キラル分子分離にシクロデキストリンを添加するなど）。ミセル動電クロマトグラフィー（MEKC）、キャピラリーゲル電気泳動（CGE）、キャピラリー等電点電気泳動（CIEF）などのCEモードでは、BGEで非揮発性界面活性剤、添加物、親水性ポリマー、または担体両性電解質を使用できます。また、キャピラリー内壁の電荷を変えるために、陽イオン性または陰イオン性ポリマーを使用することもできます。MSは真空測定手法であるため、可能であれば、BGEから非揮発性成分を除去する必要があります。例えば、CE分離に酸性pHのリン酸緩衝液を使用すると、CEの分離効率が損なわれる可能性があるため、BGEをギ酸緩衝液に変更します。中性添加物のMSへの進入は、直交型スプレー構成を使用することで回避できます。

## CE/MSシステム

MS注入口に電気的接地部を持ち、高電圧のスプレーノードを搭載したMS機器のメーカーからは、CE/MSを連結させるための、改良型ナノスプレー LC/MSインタフェースにもとづくCE/MS用の基本的なインタフェースと補助部品（位置決め装置など）が提供されています。電源、電気、および流体の接続は、ユーザーが行う必要があります。

アジレントは、長年にわたってCE/MS用の包括的なシステムソリューションを提供してきた唯一の分析機器メーカーです。このインタフェース技術の基礎となっているのが、同軸シース液流インタフェース、すなわち三重管構造のCE/MSインタフェースです。

本書では、このインタフェースを使用したCE/MSの連結に焦点を当てます。

## 6.2

### 同軸シース液流の概念

Smith と同僚らにより、CE 分離キャピラリーの先端をシース液で補助することにより、出口側の電氣的接点を湿潤させる方法が報告されました<sup>7</sup>。彼らは、外径 1.6 mm の高純度 PTFE チューブ中に CE キャピラリー (外径 0.2 mm × 内径 0.1 mm) を挿入したものを利用しました。この高純度 PTFE チューブを T ピースでシリンジポンプに接続し、シース液を流量 5 ~ 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  で送液しました。また、高純度 PTFE チューブ内に外径 0.46 mm、内径 0.25 mm の金属製ニードルを挿入し、エレクトロスプレー電圧を供給する電極に接続しました。この金属製ニードルに CE キャピラリーを通し、先端から約 0.2 mm 突き出させました。さらに、スプレーをシールドおよび冷却するために、内径 0.5 mm のステンレス製キャピラリーに窒素ガスを流量 0.1 ~ 1 L/min で流しました。

シース液は、基本的に CE の出口で緩衝液として機能し、EOF の大きさに関係なくスプレーを補助します。シース液は、エレクトロスプレーに最適な条件になるように (低粘度、低表面張力、高蒸気圧、低含水量、低 pH の溶媒混合液) 選択することができます。実際には、多くの CE/MS 分離が、低 pH 分離の場合は酢酸、高 pH 分離の場合は酢酸アンモニウムなどの揮発性緩衝液を含む BGE や、酢酸またはギ酸濃度 0.1 ~ 1.0 % のメタノールまたはイソプロパノール含有シース溶媒水を使用して行われています。

Henion と同僚らは、LC/MS 用の気流支援 ESI を開発したときと同様に (セクション 6.1 「CE/MS 連結の要件」を参照)、CE/MS の連結にもイオンスプレーを適用しました。彼らの初期の取り組みでは、スプレーニードルに印加されるエレクトロスプレー電圧の接点を設けるために、リキッドジャンクションアプローチが使用されました。その後、気流支援スプレー形成を用いた同軸シース液インタフェースが考案されました<sup>8, 9</sup>。Analytica of Branford 社の Banks<sup>10, 11</sup> は、CE キャピラリーの先端にエレクトロスプレー電位を印加すると、結果的な電場が、印加した CE 電圧とエレクトロスプレー電圧の差になることに気付きました。この発見をもとに、Banks は、CE キャピラリーの出口を接地部に接続し、ポジティブイオン MS の場合は MS 注入口に (負) 電圧を印加しました。

これと同時期に、スプレーヤーを MS のインレットキャピラリーと直交する向きに配置する LC/MS 用のイオンスプレータイプのインタフェースがヒューレット・パッカートのエンジニアにより考案されました。このインタフェースにより、大きな液滴や中性の移動相添加物が MS インレットキャピラリー側へ移動するのを防ぎ、注入口の汚染を最小限に抑えることができるようになりました。

### 6.3

#### 三重管構造のスプレーヤー

1995年、ヒューレット・パッカートのエンジニアは、セクション 6.2「同軸シース液流の概念」で説明した中の最善のアプローチと LC/MS スプレーヤーの開発の利点を活かした三重管構造のスプレーヤーを考案しました。この三重管構造のスプレーヤーは、CE キャピラリー、スプレーニードル、および外側チューブで構成されています。スプレーニードル内のキャピラリーと同軸方向にシース液が送液され、外側チューブから、スプレーの形成を補助するネブライザガスが供給されます（図 1 および図 2）。

三重管構造のスプレーヤーは、高精度エンジニアリング部品です。外径 365  $\mu\text{m}$  の標準的な CE キャピラリーを使用でき、CE キャピラリーは、その外周にある内径 0.4 mm のスプレーニードルと同軸状になるように再現性よく位置調整されます。

シース液は、スプリッタを装備したアイソクラティックポンプにより流量 1 ~ 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  で送液されます。ネブライザガスには、流量 3 ~ 10 L/min の窒素ガスが使用されます。

また、スプレーヤーは接地されますが、これは CE 電流とエレクトロスプレー電流に共通の接地になります。エレクトロスプレーの電場は、MS 側（図外）の電圧により生成されます。

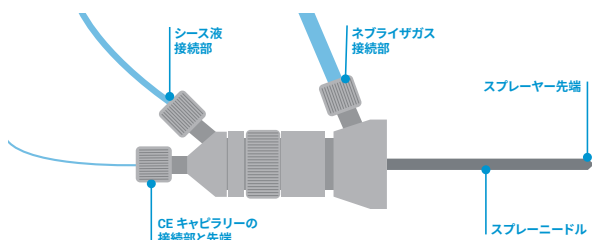


図 1. 三重管構造のスプレーヤーの概略図

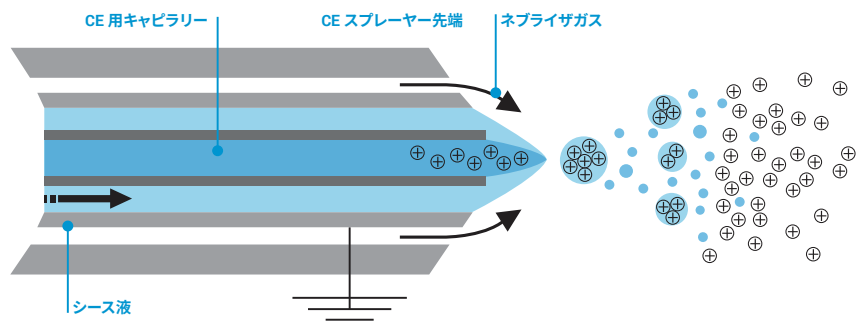


図 2. スプレーヤー先端部の簡略図

図 3 および図 4 に示すように、Agilent CE/MS システムでは、Agilent LC/MS インタフェースと同様に、スプレーヤーは質量分析計のインレットキャピラリーに対して直交方向に配置されます。この構造には、泳動バッファ中の中性添加物や大きな液滴が質量分析計に導入されない利点があります。

このインタフェースの採用により、新たに導入された実験パラメータがいくつかあります。これらのパラメータは、安定性の高いスプレーおよびイオン化プロセスを実現するために、慎重に調整し、最適化する必要があります。シース液の流量、シース液の組成、およびネブライザガスの圧力には特に注意を払ってください。これらのパラメータの推奨設定については、以降のセクションをご覧ください。

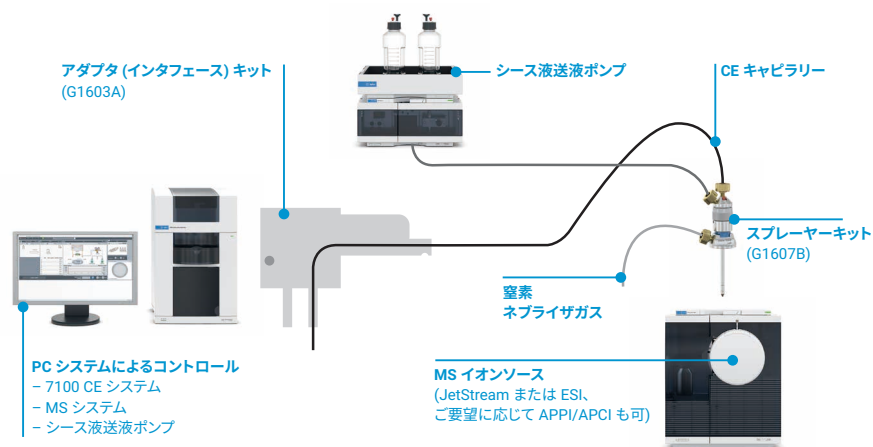


図 3. Agilent OpenLab CDS (ChemStation Edition) ソフトウェアでコントロールされる Agilent CE/MS システム

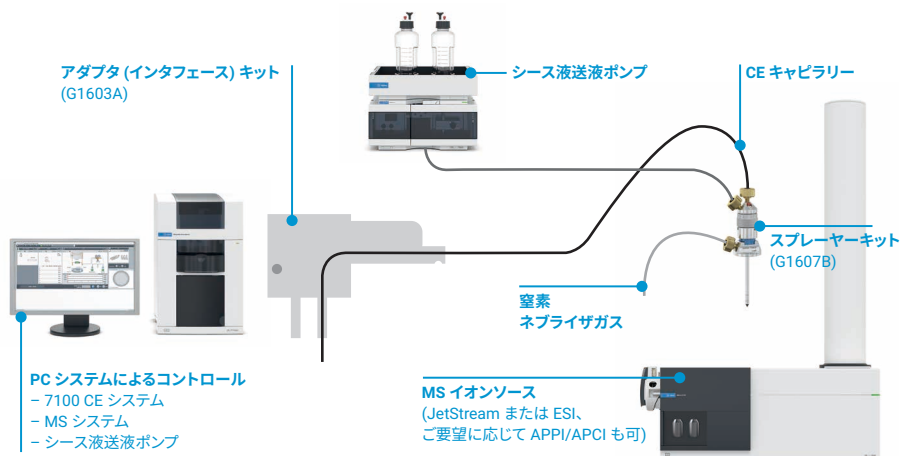


図 4. Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアでコントロールされる Agilent CE/MS システム

## 7 アジレントの CE/MS システム

### 7.1 システムの概要

CE/MS システムの開発は、アジレントのクロマトグラフィーシステムおよび質量分析計用のデータ採取/処理ソフトウェアの開発と並行して行われました。1999 年の CE/MS の発売時には、インタフェースパラメータのコントロール、MS データ採取、およびデータ処理の各機能が CE 用の Agilent ChemStation ソフトウェアのグラフィカルユーザーインタフェースに組み込まれました。ChemStation ソフトウェアでコントロール可能な質量分析計はシングル四重極マスアナライザでした。現在は、すべての Agilent MS アナライザに Agilent CE/MS の三重管構造インタフェースを連結できるようになっています。セクション 7.2「システムの詳細」に示すように、このインタフェースは、2つのソフトウェアプラットフォームで利用できます。

### 7.2 システムの詳細

Agilent OpenLab CDS 付き Agilent CE/MS システムは、以下のコンポーネントで構成されています。

- Agilent 7100 キャピラリー電気泳動システム
- Agilent CE/MS アダプタキット (CE/MS カセット、検出器用 PEEK アライメントインタフェース、アクセサリ) (G1603A)
- Agilent CE スプレーヤーキット (Agilent Jet Stream にも互換性がある ESI-MS スプレーヤー、シース液用フロープリッタ、アクセサリ) (G1607B)
- API エレクトロスプレーイオンソース (G1948B) または Agilent Jet Stream イオンソース (G1958B) 搭載 Agilent InfinityLab LC/MSD シリーズシステム
- Agilent 1260 Infinity II アイソクラティックポンプ (G7110B)
- Agilent 1260 Infinity II デガッサ (G7122A)
- Agilent OpenLab CDS (ChemStation Edition) ソフトウェア (M8301AA)
- OpenLab CDS ソフトウェア用 CE ドライバ (M8501AA)
- OpenLab CDS 用 MS ドライバ (シングル四重極 MS を使用する場合のみ必要) (M8361AA)

新しいマスアナライザが発売され、Agilent MassHunter ソフトウェアでも CE 設定、コントロールを行うことができるようになりました。Agilent 飛行時間型、トリプル四重極、またはトリプル四重極飛行時間型 LC/MS 搭載の Agilent CE/MS システムは、以下のコンポーネントで構成されています。

- Agilent 7100 キャピラリー電気泳動システム
- Agilent CE/MS アダプタキット (CE/MS カセット、検出器用アライメントインタフェース、アクセサリ) (G1603A)
- Agilent CE スプレーヤーキット (Agilent Jet Streamにも 互換性のある ESI-MS スプレー、シース液用フロースプリッタ、アクセサリ) (G1607B)
- Agilent デュアルスプレー ESI イオンソース (G3251B) または Agilent Jet Stream デュアルスプレー ESI イオンソース (G1959A) 搭載 Agilent 四重極飛行時間型 LC/MS システム
- Agilent 1260 Infinity II アイソクラティックポンプ (G7110B)
- Agilent 1260 Infinity II デガッサ (G7122A)
- Agilent 飛行時間型 LC/MS、トリプル四重極 LC/MS、または四重極飛行時間型シリーズ LC/MS システム用 Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア

## 8 CE/MS 分析システムに最適なパラメータ

CE は多用途性に優れた分離法であり、さまざまな分離モードを利用できる他、分析対象成分に最適な条件にメソッドをチューニングすることができます。各 CE 分離モードは一連の CE 分離パラメータに従って動作し、これらのパラメータはモードによって大きく異なります。最大限の分解能と感度を引き出すためには、これらのパラメータを注意深く選択し、最適化する必要があります。ただし、CE 分離モードに最適なパラメータが MS 検出感度に悪影響をおよぼすこともあるため、CE 分離モードの選択、BGE の選択、および CE パラメータの最適化は、十分に考慮して行わなければなりません。アジレントの同軸シース液流インタフェースは、複数のイオン化モードに対応しています。S/N 比および動作安定性を最大化するために慎重に選択する必要のあるパラメータは、選択するモードによって決まります。最後に、最善の S/N 比および質量分解能が得られるように、質量分析計に固有のパラメータを調整する必要があります。

以下に、パラメータの選択についてまとめます。

### 1. CE の分離メソッドとパラメータの選択:

- a. CZE、**MEKC**、**CGE**、**CIEF**、**CITP**、**CEC** などの動作モード\*
- b. バックグラウンド電解液 (BGE) の組成、pH、およびイオン強度と、緩衝液、有機溶媒、添加物の種類
- c. 分離キャピラリー、寸法、壁面コーティング、温度
- d. 電場、極性
- e. 注入法 (特にプレ濃縮手法に関して)

### 2. CE/MS インタフェースの選択:

- a. イオン化の種類: ESI、APCI、APPI
- b. シース液の流量、組成、および送液方法
- c. その他のパラメータ: ネブライザガス圧力、乾燥ガス温度、流量
- d. エレクトロスプレー形成のための電場および極性

### 3. MS データ取り込みパラメータの最適化:

- a. S/N 比、質量分解能、フラグメンタ電圧の (オート) チューン
- b. 取り込みレート、ドウェルタイム

このようにパラメータは多岐にわたるため、実際に使用する際には、最適化に多面的に取り組むこととなります。この章の目的は、CE/MS メソッド開発に着手する際の適切な開始条件を示すことです。

MS データ取り込みパラメータの最適化はこのガイドラインの範囲外です。詳細については、MS に関する適切な文献をご覧ください。また、パラメータは、作成したメソッドと **パート 2 「CE/MS の実際」** で紹介するアプリケーションノートに従って指定します。

\* アジレント・テクノロジーの入門書「キャピラリー電気泳動入門書」(資料番号 5990-3777JAJP) では、すべての CE 分離モードの概要をご覧いただけます。一般に、MEKC、CGE、CIEF、または CEC モードは CE/MS には互換性がないため、使用は推奨されません。

## 9 CE の分離メソッドとパラメータの選択

### 9.1 CE の分離モード

CE の分離モードのうち、最も広く使用されているのが CZE です。CZE は、荷電化合物、イオン化化合物、極性化合物、HMW および LMW 化合物の分離に最適です。

MEKC で使用される BGE には、ドデシル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤が添加されます。これらの界面活性剤は MS 信号強度の大幅な低減とノイズの増加を引き起こし、ESI の検出下限に著しい悪影響をおよぼします。そのため、MEKC および MEEKC を三重管構造インタフェースで MS と連結する場合は、ESI の代わりに APPI が使用されています。これは、APPI のイオン化メカニズムが、BGE 中に存在する界面活性剤の影響を受けにくいからです（セクション 9.7 「イオン化の種類 – ESI、APCI、APPI」を参照）。

CGE および CIEF で使用される BGE 中にも添加物が存在し、これがイオン化プロセスに影響し、低いイオン化効率と高いバックグラウンドを引き起こします。これらの CE メソッドでは、不要なポリマーゲルや両性電解質が MS に導入されないように、キャピラリーの部分的充填などの特殊な予防措置を取る必要があります。

これに対し、CITP モードでの分離では、リーディング電解液とシース液に同じ溶液を使用できるため、MS との連結に適しています。実際、CITP は CZE と組み合わせることで、プレ濃縮法として使用されています（セクション 9.5 「サンプル導入方法」を参照）。

CEC は、BGE が LC/MS で使用される溶媒と似ていることから、MS 検出との連結に適しています。ただし、CEC が CE 分離に広く適用されることはありませんでした。CEC では通常、キャピラリー内での気泡の形成を防ぐために、キャピラリーの両側から圧力をかける必要がありましたが、これが普及に至らなかった理由の 1 つです。また、堅牢性と信頼性においても、CEC は CZE に劣ります。

CE の分離モードについては、アジレント・テクノロジーの入門書「キャピラリー電気泳動入門書」（資料番号 5990-3777JAJP）をご覧ください。

### 9.2 BGE の組成

一般に、CE 分離の BGE には、リン酸やホウ酸などの無機緩衝液が適しています。これらの緩衝液は緩衝能とイオン強度が高く、低濃度で使用できるため、シャープで分離能の高いピークが得られます。ただし、CE/MS では、BGE での非揮発性無機緩衝成分の使用は避けなければなりません。非揮発性緩衝液成分中の塩がエレクトロスプレーチャンバや MS 注入口に析出し、インレットキャピラリーが詰まる可能性があるからです。この詰まりは、さらに感度や装置に対する信頼性の低下を引き起こし、MS の故障につながるおそれもあります。

代わりに、低 pH 分離には、ギ酸や酢酸などの揮発性の酸性および塩基性緩衝液を、また高 pH 分離には、アンモニウム塩やトリアルキルアンモニウム化合物の緩衝液を使用することを推奨します。

CE 分離中に高電流（およびそれによって生じるジュール熱）が発生しないようにするために、これらの緩衝液は、分離（ピーク形状および分離能）に悪影響をおよぼさない範囲で、できる限り低い濃度（50 mM など）に抑える必要があります。

分析成分分子は、分離緩衝液（BGE）の pH に応じてカチオン（正）またはアニオン（負）荷電状態になります。この荷電により、正（正極性）と負（逆極性）のどちらの CE 電圧を印加すべきかが決まります。シース液には、分離緩衝液と異なる pH のものを使用することもできます。例えば、BGE に対し過剰量のシース液により、CE 分離で陰イオンとして分離された弱酸が中和され、エレクトロスプレーでは陽イオンとしてイオン化させることができます。

CE 分離と MS を連結する場合は、これらの現象を考慮してメソッド開発する必要があります。実際、CE メソッドを開発する際は UV 検出にもとづき行いますが、CE/MS では MS 検出条件も考慮しなければなりません。

### **BGE の特殊なケース**

BGE には、選択的な分離を行うために必要な添加物を添加することができます。例えば、エナンチオマー混合物を分離するための分離緩衝液には、シクロデキストリン、キラルクラウンエーテル、大環状抗生物質、またはキラル界面活性剤を添加します。MEKC では、疎水性相互作用を誘起し、例えば中性または弱酸性/塩基性薬物などを分離するために、界面活性剤を使用します。

これらの添加物が電荷を帯びていなければ、質量分析計に導入されることはありません。これは、三重管構造のスプレーヤーアセンブリが Agilent 質量分析計の注入口に対して直交方向に配置されているからです。

ただし、CE 分離時間をコントロールし、選択性を高めるために使用される添加物は、荷電しているものがほとんどです（CIEF の両性電解質など）。これらの荷電添加物は ESI によるイオン化プロセスに関与し、利用可能な電荷をめぐって分析成分と競合する可能性があります（これを「イオン抑制」と言う）。

添加物の電荷が分析成分と同じ場合、添加物が質量分析計に導入されてしまう場合があります。マスアナライザを質量選択モードでデータ採取を行った場合でも、添加物イオンの存在により、質量分析計のバックグラウンドが高くなります。また、MEKC では、分離緩衝液中の界面活性剤によってインタフェースが汚染されます。この汚染は、除去が困難なうえ、エレクトロスプレーイオン化による選択性を大幅に低下させます。

このような理由から、ESI を使用した CE/MS では、MEKC や CIEF などの手法はあまり使用されていません。これらの問題を回避するために、CE キャピラリーの部分的充填<sup>12</sup> などの特殊な方法が適用されています。ただし、これらの特殊な方法を使用した分離メソッドは状況によって大きく異なるため、ここでは説明を省略します。

フューズドシリカチューブは、内径の大きなシリカを約 1300 °C の不活性雰囲気下で引き伸ばすことにより成形されます。この条件下では、キャピラリー表面のシラノール基が完全に縮合し、シロキサン結合が形成されます。また、引き伸ばし時にキャピラリーの外側がポリイミド外皮層で被覆され、フューズドシリカチューブには、本来の柔軟性に加えて、きわめて高い堅牢性と圧力安定性が付加されます。成形直後のフューズドシリカの内面は疎水性ですが、保管中は湿気によって、また最終的には CE で使用される緩衝液によって、時間の経過とともに内面が徐々に再ヒドロキシル化されます。

内面の残留シラノール濃度とシリカ中の残留（金属）不純物の量により、フューズドシリカチューブのバッチ間で EOF にばらつきが生じます。キャピラリー内面のヒドロキシル化を確実に再現性の高い状態にするためには、最初に厳密な前処理およびプレコンディショニング手順を実施する必要があります。キャピラリーの前処理には、通常、1 M の水酸化ナトリウムを使用します。または、高濃度の塩酸で一晩処理します。その後、キャピラリーを水と BGE で洗浄する必要があります。

プレコンディショニング操作の厳密なプロトコルに従うことが、CE のルーチン作業の一般的手順となっています。また、分析間で BGE によって簡単なクリーニングとプレコンディショニングを行う洗浄手順をルーチンメソッドに組み込む必要があります。結局のところ、フューズドシリカキャピラリー内で起こる電気浸透流の強さと再現性は、前処理や直前の操作の他、BGE の組成、pH、およびイオン強度に大きく左右されます。

キャピラリーの前処理手順の詳細については、[アジレント・テクノロジーの入門書「キャピラリー電気泳動入門書」](#)（資料番号 5990-3777JAJP）のセクション 4.2 をご覧ください。また、「*Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis*」（Eds. S. Ahuja and M.I. Jimidar, Academic Press, 2008, London）には、再現性の高い CE 分析のためのキャピラリーの前処理および取り扱いに関する豊富な実用的情報が記載されています。これらの事柄の詳細は本書には記載されていません。

### CE/MS 用のフューズドシリカキャピラリー

CE および CE/MS 用のキャピラリーは内径 20 ~ 100  $\mu\text{m}$  で、50  $\mu\text{m}$  および 75  $\mu\text{m}$  のものが最も広く使用されています。Agilent CE/MS システムで使用されるキャピラリーの標準的な外径は 365  $\mu\text{m}$  です。特殊なアプリケーションでは、外径 180 ~ 220  $\mu\text{m}$ 、内径 20 ~ 30  $\mu\text{m}$  のキャピラリーが使用されることもありますが、Agilent 7100 CE システムではこれらのキャピラリーの使用は推奨しません。分離キャピラリーは 2 台の機器間の距離を橋渡す必要があるため、通常は長さ 1000 mm のキャピラリーが使用されます（特に、CE システムのダイオードアレイ検出器を使用する場合）。

CE の標準的な操作と同様に、CE/MS でも、キャピラリーの注入側および出口側の先端が平坦であること、また損傷していないことが必要になります。キャピラリーの注入口側の先端が平坦でないか損傷していると、電場分布が不均一になり、注入時にサンプルが拡散します。また、CE/MS 用キャピラリーの出口側の先端が損傷していると、スプレーが歪んで不安定になり、質量分析計のノイズの増加と感度の低下につながります。未修飾フューズドシリカキャピラリーをリールからカットして使用できますが、その際は Agilent CE キャピラリーカラムカッター (p/n 5183-4669) などの精密カッターを使用することが重要です。

このように自分でカットすることもできますが、先端の 1 ~ 2 mm 部分のポリイミドを除去したアジレントのカット済み CE/MS 用フューズドシリカキャピラリーを使用することを推奨します。経験上、先端部のポリイミドが除去された CE/MS キャピラリーの方が安定したスプレーが得られます。また、これらのカット済みキャピラリーには、UV-Vis 検出用のウィンドウが付いています。詳細については、アジレントの「[Guide to Capillaries, Reagents, and Supplies for CE](#)」(資料番号 5991-5623EN) をご覧ください。

フューズドシリカチューブをリールからカットして使用する場合は、[セクション 14.1 「キャピラリーの準備」](#) で説明するキャピラリーのカット手順に従うことを推奨します。

### 共有結合で中性または荷電した層を有するキャピラリー

ペプチドおよびタンパク質を分離する場合、吸着を最小限に抑え、強力な EOF を維持するには、キャピラリー内壁の永久電荷が効果的に働いたり、必須条件になる場合があります。分析成分の吸着を防ぐためには、内壁の電荷は分析成分と同じ極性なければなりません。すなわち、溶質をその電気泳動モビリティに逆らってキャピラリー出口方向へ移動させるには、高い EOF が必要です。例えば、壁面が正電荷でコーティングされている場合、BGE 中の陰イオンによって EOF が生じますが、これを出口方向へ移動させるためには、出口側の電極は陽極でなければなりません。すなわち、正電荷の溶質は、EOF とは逆方向に陰極に向かって移動することになります。注入口側バイアル内の BGE にわずかな圧力をかけて EOF を促進することで、逆電荷の分析成分もキャピラリー出口（ここではスプレーノードル）に向かって押し流されることが報告されています。

あるいは、特定の CE 分離では、EOF を発生させたくない場合があります。その場合、キャピラリー内面をコーティングで中性の親水性にすることで、EOF を抑制し、溶質の吸着を最小化する必要があります。中性の親水性コーティングのキャピラリーは、複数のメーカーから入手できます。詳細については、アジレントの「[Guide to Capillaries, Reagents, and Supplies for CE](#)」(資料番号 5991-5623EN) をご覧ください。

### 連続的多重イオン層

正電荷または負電荷の永久共有結合層を持つ CE キャピラリーは高価なため、広くは普及していません。動的に生成される壁面コーティングが EOF のコントロールまたは中性化において同等の役割を果たすことが、多くの CE 分析で実証されています。また、この効果は標準的なフューズドシリカ CE キャピラリーでも得られることから、はるかに経済的です。Lucy 他<sup>13</sup> および Huhn 他<sup>14</sup> による広範かつ詳細なレビューでは、コーティングと BGE 添加物による EOF のコントロールアプローチについて論じられています。

連続的多重イオン性高分子層 (SMIL) によるフューズドシリカキャピラリー内面の動的コーティング法が確立されています。SMIL によるコーティングは、生成が容易で安価であり、幅広い緩衝液条件に適用でき、しかも MS 検出を妨げることもありません。

SMIL によるコーティング手順は、Katayama<sup>15</sup> により提唱されました。その概略図を図 5 に示します。

アニオン性シラノール基をコーティングする第 1 層には、カチオン性ポリマーであるポリブレン (臭化ヘキサジメトリン) が一般に使用されます。第 2 層には、硫酸デキストランやスルホン酸ポリエチレンなどのアニオン性ポリマーが使用されます。カチオン性の表面を持つ 3 層コーティングも実証されています。

SMIL コーティングは、幅広い pH 領域、緩衝液の種類、および添加物の BGE で優れた安定性を発揮することが確認されており、BGE 中にイオン性ポリマーは必要ありません。実際、最上層のイオン性ポリマーでキャピラリーコーティングを時々再コンディショニングすれば十分です。そのため、SMIL コーティングを持つ CE キャピラリーは、質量分析法との連結に非常に適しています<sup>16</sup>。Analisis 社からは、多様な SMIL 用キットが提供されています<sup>17</sup>。

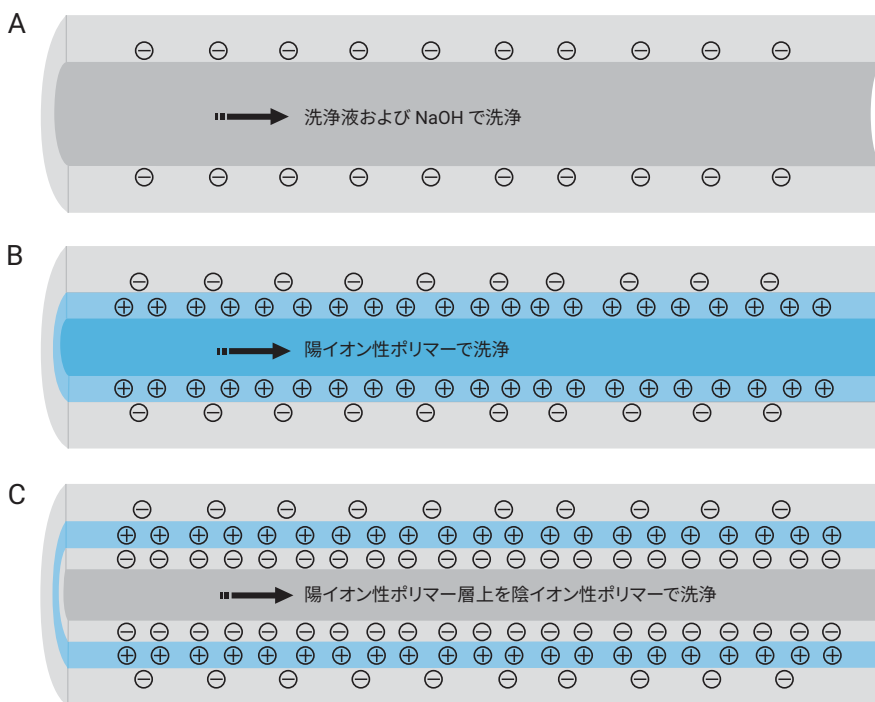


図 5. SMIL コーティング手順: (a) シラノール基の活性化、(b) 第 1 層コーティング、(c) 第 2 層コーティング

## キャピラリーの取り付けと温度調節

キャピラリーの取り扱いおよび CE/MS カセットへの取り付けの詳細については、[セクション 14.2 「CE/MS カセットへのキャピラリーの取り付け」](#)で説明します。

Agilent 7100 CE システムでは、キャピラリーは、注入口側および出口側バイアル内の電極から突き出したキャピラリー部分とは別に温度調節されます。CE キャピラリーを質量分析計のスプレーヤーに接続する際には、2 台の機器間の距離を橋渡しする必要があり、分離キャピラリーの一部が温度管理環境から外れることになります。その一方、環境の温度変動が泳動時間精度に影響をおよぼすことが報告されています<sup>18</sup>。

この影響を抑えるために、キャピラリーカセット内の温度は、ラボの平均温度に設定します。また、CE/MS は、温度管理されたラボで行い、キャピラリーを室内の通風から保護することを推奨します。

[セクション 14.2 「CE/MS カセットへのキャピラリーの取り付け」](#)で説明しますが、電気絶縁用に PTFE チューブが提供されています。このチューブは、分離キャピラリーを温度変動からある程度保護する役割も果たします。

## 9.4 電場と極性

CE では、二極性 DC 電源により最大約 30 kV の電圧が印加されます。Agilent 7100 CE システムの電源では、最大 300  $\mu$ A (9 W) の電流を供給できます。電圧は、注入口側バイアル内の電極に印加します。正電圧を印加すると、注入口側バイアル内の電極が陽極になり、未修飾フューズドシリカキャピラリー内を EOF が出口方向に流れます。この場合、接地接続された三重管構造インタフェース内のスプレーニードルが陰極になります。

キャピラリー内面の電荷が正の場合、EOF をキャピラリーの出口方向に流すためには、注入口側に負電圧を印加する必要があります。この場合、注入口側バイアル内の電極は陰極になり、接地電位に接続されたスプレーニードルが陽極になります。

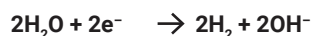
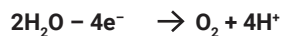
CE/MS で三重管構造インタフェースを使用することで、印加電圧の極性に制限なく CE システムの操作が可能になります。推奨事項については、[アジレント・テクノロジーの入門書「キャピラリー電気泳動入門書」](#) (資料番号 5990-3777JAJP) のセクション 3.1 をご覧ください。

ただし、ユーザーが認識しておかなければならない重要な事柄がいくつかあります。これについて以降のセクションで説明します。

## 電極反応

CE での分離中は DC 電流が流れることを理解しておくことが重要です。この電流は BGE 内の電解質イオンによって運ばれます。電極では、レドックス半反応によって電荷が溶液から電極へ転送されます。CE では通常、プラチナやパラジウムなどの貴金属製の電極が使用されます。

正極性モードでは、注入口側の電極が陽極になり、ここで水が酸化されます。一方、出口側の陰極では、水が還元されます。これを表す半反応は以下のとおりです。



逆極性モードでは、注入口側の電極が陰極になり、出口側バイアル内の電極が逆になります。この場合、半反応も逆になります。

Agilent 7100 CE システムの電極は、内径0.5 mm、外径 1.0 mm のプラチナ/パラジウム合金製の貴金属チューブです。この合金は水より不活性なため、電極を変化させたり侵食したりする電気プロセスが生じません。

CE を使用する際は、これらの電解プロセスについて理解しておかなければなりません。このプロセスによりバイアル内の BGE の pH が変化する可能性があるため、分析を数回行うごとにバイアルを交換するかバイアル内の BGE を補充する必要があります。CE/MS の正極性モードでは、スプレーニードルで水が還元されます。これにより、CE キャピラリーとスプレーニードル間の環状の隙間に微細な気泡が形成されますが、シース液によってスプレーヤーの開口端から押し出されます。

スプレーニードルはステンレス製のため、逆極性モードでは（キャピラリー内面がカチオン性で、EOF が BGE 中のアニオンによって流れる）、スプレーニードルが陽極になります。鉄およびニッケルは水より不活性ではないため、水が酸化される代わりに、スプレーニードル中の鉄およびニッケルが酸化され、それぞれのカチオン  $\text{Fe}^{2+}$  および  $\text{Ni}^{2+}$  が生成されます<sup>19</sup>。これらのイオンは EOF に逆らって CE キャピラリー内に移動し、不溶性の酸化物を生成します。この酸化物によりキャピラリー内の EOF が妨げられ、最終的にはキャピラリーが詰まるおそれがあります。また、エレクトロスプレーの安定性と MS 検出の感度にも悪影響がおよびます。

このような状況への対策として、プラチナ製スプレーニードルを使用することを推奨します (p/n G7100-60041)。ステンレス製スプレーニードルの交換手順については、[セクション 22.1 「CE/MS スプレーヤーキットの組み立て」](#)で説明します。

## ダイオードアレイ検出器用のアライメントインタフェース

Agilent CE/MS システムでは、ダイオードアレイ検出器 (DAD) を迂回し、すべての溶質をそのまま三重管構造のスプレーヤーに送り込むこともできます。DAD の検出感度は MS 検出ほど高くありませんが、CE/MS 分離メソッドの開発においては、DAD が非常に役立つことがわかっています。CE システムで DAD を使用する場合、注入口から 21.5 cm の位置が検出ポイントになり、そこから三重管構造のスプレーヤーまで 80 cm あります。

CE 分離の分析時間はキャピラリーの検出器までの長さによって決まります。すなわち、DAD を使用する CE/MS では、DAD で検出される分離よりさらに進行した分離が MS で検出されることになります。

CE/MS で DAD を使用する場合に考慮すべき事柄がもう 1 つあります。検出部では、CE キャピラリー内の電圧が約 20 % 低下します。フューズドシリカは優れた絶縁体であり、通常は電流がキャピラリー外へ漏出することはありませんが、金属製のアライメントインタフェースから接地済みの検出器ハウジングへのアーク放電が時々発生することが観察されています。この現象により、キャピラリーの内壁または外側のコーティングにわずかな欠陥や損傷が生じることがあります。標準的な CE 操作では、この問題を緩和するために、検出部で 80 ~ 90 % の電圧降下が行われてきました。

CE/MS でこれらの問題を最小限に抑えるために、PEEK 製のアライメントインタフェースを使用することを推奨します。このインタフェースにより、CE キャピラリーと検出器ハウジング間の絶縁が強化されます。また、前述の理由から、CE/MS で光路の長い (バブルセル) CE キャピラリーや高感度の検出器セルを使用することは推奨しません。

## 9.5 サンプル導入方法

UV検出を使用する CE は、濃度がある程度高い場合に用いることができる分析法です。CE で光路長の短い光学検出を使用した場合、サンプル溶液中の溶質に対する検出下限は 10 μM レベルです。一般に、質量分析検出の LOD はその 1/10 ~ 1/100 で、さらに構造情報も得られます。

CE では、サンプルの導入を EOF (電気浸透流) または流体流れ (圧力駆動) により行えます。CE/MS では、CE 分離キャピラリーへのサンプル導入方法として加圧注入を使用することが推奨されます。一般に、サンプル量は nL レベルであり、その値は以下の式で求めることができます。

$$V_{inj.} = \frac{\Delta P \cdot d_c^4 \cdot \pi \cdot t_{inj.}}{128 \eta \cdot L}$$

$\Delta P$ : 注入時の平均圧力降下

$d_c$ : キャピラリー内径

$t_{inj.}$ : 注入時間

$\eta$ : サンプル溶媒の粘度

$L$ : CE キャピラリーの合計長さ

注入ゾーンの長さは数ミリメートルになります。HPLC での注入方法とは異なり、CE では、サンプル量を増やすと、必ず分離効率に悪影響がおよびます。これは、注入量が増加すると、検出法の感度とは関係なくゾーンの幅が広がり、ピークの高さにはつながらないからです。

CE キャピラリーの内径を大きくするのが、注入量を増やす効果的な手段のようにも思えますが、キャピラリーの内径の 2 乗に比例して電流が増加し、それに伴ってジュール熱も増加します。大きな内径のフューズドシリカキャピラリーからの熱伝達はゆっくり起こるため、温度分布が不均一な放射状になり、ゾーンに歪みが生じることになります。

CZE/MS では、常に圧力によるサンプル導入を使用することを推奨します。また、CGE による分離や、この章の「[サンプルの動電学的プレ濃縮](#)」で説明するサンプルのプレ濃縮には、電場駆動のサンプル導入を使用することを推奨します。

### サンプル導入とキャリーオーバー

セクション 9.4「電極反応」で説明したとおり、Agilent 7100 CE システムで使用される電極は円筒管状です（外径 1.0 mm、内径 0.5 mm）。この構造は堅牢であり、バイアル交換の際にも分離キャピラリーが保護され破損が防がれますが、サンプルキャリーオーバーのリスクがわずかに伴います。キャリーオーバーは、サンプルバイアルと BGE を交換するときに、キャピラリーと電極壁間の環状の隙間に残されたサンプル溶液によって生じます。このキャリーオーバーを最小限に抑えるためのトラブルシューティング手順があります。[第 20 章「トラブルシューティング」](#)をご覧ください。

### サンプルの動電学的プレ濃縮

大量のサンプルを注入して CE の感度を高めるには、HPLC における固相抽出 (SPE) のように、注入ゾーンの体積を小さくする必要があります。CE では、CE キャピラリーに短い粒子充填ゾーンを組み込むことが難しいため、SPE が使用されることはほとんどありません。

一方、長い注入ゾーンを界面動電集束によって圧縮できることから、CE では複数の界面動電サンプリング手順が広く適用されています。このような手法の概要については、[アジレント・テクノロジーの入門書「キャピラリー電気泳動入門書」](#)（資料番号 5990-3777JAJP）のセクション 3.2.3 をご覧ください。Breadmore および Sanger-van de Grient により、これらの手法の概要が示されていますが<sup>20</sup>、そのすべてを CE/MS でのサンプル濃縮に適用できるわけではありません。一部の手法では、MS 検出を使用する場合に避けるべき添加物がサンプルまたは BGE で使用されています。CE/MS では、表 1 にあげるプレ濃縮法を使用することを推奨します。

これらの手法の詳細については、参考文献および[アジレント・テクノロジーの入門書「キャピラリー電気泳動入門書」](#)（資料番号 5990-3777JAJP）の 65～72 ページをご覧ください。

表 1. CE/MS で推奨されるプレ濃縮法

電場駆動のプレ濃縮法	
電場増幅試料 スタッキング (FASS)	サンプルは圧力により注入されます。サンプル溶媒には、BGE より導電率が低いものを使用します。サンプルゾーン内は電場強度が高いため、溶質は BGE 内よりも速く移動します。その後、より導電率の高い BGE との境界に達すると、溶質は減速し、濃縮されます <sup>21</sup> 。
動的 pH ジャンクション法	サンプル溶媒には、BGE とは pH の異なるものを使用します。分析成分はサンプルゾーン内でより高いモビリティを持つため、BGE との境界で濃縮されます <sup>22</sup> 。
pH を利用した FASS	サンプルを強塩基と強酸の間に挟み込みます。電圧を印加すると、OH <sup>-</sup> および H <sup>+</sup> イオンがサンプルゾーンに移動して中和します。これにより導電率が低下し、濃縮を行えるようになります <sup>23</sup> 。
過渡的等速電気泳動 (tITP)	サンプルを、より移動度の大きい共イオン (リーディング電解液) と、より移動度の小さいターミナル電解液の間に挟み込みます。電圧を印加すると、分析成分が移動度の順に並びます <sup>24</sup> 。
液相マイクロ抽出 (LPME)	単一滴マイクロ抽出: 分析成分は、キャピラリー先端にぶら下がった有機溶媒の小滴中に抽出されます <sup>25</sup> 。 この方法は、市販機器に変更を加えることなく行えます。
圧力駆動のプレ濃縮法	
キャピラリー内 SPE	キャピラリー内に、大きな多孔質粒子を充填した短いゾーンを作ります。分析成分は、HPLC と同様に抽出され、溶出します <sup>26</sup> 。

### CE/MS におけるサンプル導入の精度

UV検出とは異なり、ESI-MS の検出器のレスポンスは多くの要因に左右されます。これらの要因には、イオンの形成プロセス、イオンの捕捉および導入、磁場および電場の集束、フラグメンテーションプロセスなどが含まれます。実際には、イオンとしての溶質のレスポンスの再現性は、10 % 未満であれば良好と見なされます。

多くの CE 機器では、加圧注入することで、サンプル導入の再現性は大幅に改善されます。サンプル注入プロセスのばらつきは、標準溶液および未知サンプルの両方に内部標準を使用することにより排除できます。この他、EOF のばらつきや化合物の移動度がピーク面積の変動要因になることがあります。MS 検出についても同じことが言えます。理想的には、測定対象の化合物の安定同位体標識化合物 (重水素化合物など) を利用できれば、測定精度は明らかに向上します。

LC/MS で使用される ECHO メソッドと比較した、遅延標準注入法による CE/MS の定量再現性の向上に関する論文が、Schappler 他により発表されています<sup>27</sup>。Schappler らが使用したサンプルはインスリンです。このアプローチでは、最初に既知濃度の標準溶液が注入され、続いて BGE のゾーンが注入されました。次に、未知化合物を含むサンプルが注入され、分析が開始されました。著者らは、このサンプル導入方法では十分な再現性が得られないと判断し、注入のばらつきを補正するために、標準溶液と未知サンプルの両方に内部標準を追加しました。これらの対処法を組み合わせることで、製剤中のインスリンの測定において全体で 2 % という精度が達成されました。

## 9.6

### CE/MS インタフェース – イオンソース

図3 および図4 に示したように、三重管構造のスプレーヤーはハウジングに接続され、このハウジングを MS 機器に取り付けることで、スプレーヤーが MS 注入口の前に配置されます。イオン化プロセスに必要なスプレーヤーおよびその他すべての部品が収納されたハウジングは、イオンソースと呼ばれます。このハウジングは、CE 分離および溶質のイオン化プロセスで使用される電圧用の安全な電気環境を提供するために必要になります。また、ハウジングにより、温度を設定し、ラボ環境内の妨害要素（気流、温度変動）からスプレーヤーを隔離し、管理された安全な方法で廃液を廃棄することができます。

Agilent CE/MS システムで使用されるイオンソースは、LC/MS で使用されるものと同じです。CE/MS では、標準的な LC スプレーヤーの代わりに三重管構造のインタフェーススプレーヤーが使用されます。Agilent LC/MS システム と CE/MS システムを切り替えるために必要な操作は、スプレーヤーの交換のみです（シース液の追加を除く。第15章「Agilent 1260 Infinity II のポンプおよび真空デガッサの準備」を参照）。

## 9.7

### イオン化の種類 – ESI、APCI、APPI

アジレントのイオンソースには、それぞれ原理の異なる標準イオンソースと Jet Stream イオンソースの2種類があります。Jet Stream イオンソースでは、高温のシースガスによりスプレーブルームの広がりが抑えられます。この機能は、LC/MS で使用される高流量において特に重要になります。詳細については、アジレント・テクノロジーの技術概要「Agilent Jet Stream Thermal Gradient Focusing Technology」（資料番号 5990-3494EN）をご覧ください。

標準イオンソースは、以下の4種類の大気圧イオン化法に対応した複数のモデルとして提供されています。

- エレクトロスプレーイオン化 (ESI)
- 光イオン化 (APPI)
- 化学イオン化 (APCI)
- デュアルモードイオン化 (APCI と ESI を1つのイオンソースに統合)

APPI および APCI 用のアジレントのイオンソースで CE/MS スプレーを使用するには、アダプタが必要です。このアダプタは無料で提供されています。ご希望の方は、アジレント担当営業にお問い合わせください。

設計上、Agilent Jet Stream イオンソースは ESI にも対応しています。すなわち、CE/MS に適用できる LC/MS イオンソースは全部で5種類です。ただし、実験上の制約がいくつかあります。これについては、第10章で詳しく説明します。

イオン化モードの詳細については本書の範囲外のため、興味のある方は MS に関する教本を参照してください。

CE 分離で扱うサンプルは、主に荷電物質、イオン化物質、高極性物質であるため、通常は ESI を選択することになります。一方、APPI および APCI イオンソースは、中性および低極性分子のイオン化に適しており、とりわけ高流量分析条件である LC/MS において有効であり、ESI に比べマトリックス効果やイオン抑制の影響を受けにくいと知られています。

CE/MS では、APPI および APCI イオンソースは特殊なケースに使用されてきました。例えば、Markides<sup>28, 29</sup> 他やその他の著者<sup>30, 31</sup> は、CE/APPI-MS がエレクトロスプレーイオン化法に代わる実行可能な手段であると述べています。特に、MEKC 分離では、イオン化プロセスが界面活性剤の存在に妨げられなくなります。CE/APCI-MS についても、同様の結果が De Jong 他<sup>32</sup> により報告されています。どちらの研究グループでも、APPI および APCI としてアジレントのイオンソースが使用されました。詳細については、参考文献をご覧ください。

## 9.8

### シース液の組成と送液

セクション 9.2 「BGE の組成」で説明したとおり、シース液は、アジレントの三重管構造の CE/MS 用スプレーインタフェースにおいてきわめて重要な役割を果たします。シース液により、CE 分離のためのスプレーニードル電極およびエレクトロスプレー形成のための電圧への液体電気接続が可能になります。このインタフェースを適切に機能させるには、シース液を一定の流量 (1 ~ 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) で送液する必要があります。定流量のシース液により、EOF の大きさや方向に関係なく、エレクトロスプレーを維持することができます。また、低粘度、低表面張力、高蒸気圧のシース液を選択することで、エレクトロスプレーの堅牢性と安定性を高めることができます。

シース液が持つこれらの 2 つの基本機能の他、シース液を使用することにより、CE/MS の多用途性がさらに広がる可能性があります。例えば、低 pH または高 pH のシース液を選択すると、分析成分の荷電状態は確実に正 (カチオン) または負 (アニオン) になります。これにより、分子をアニオンとして分離し、エレクトロスプレーで中性分子、極性分子、またはカチオンとしてイオン化することも可能です。

スプレーでの精巧な化学反応によりタンパク質の荷電が促進されることが、最近の論文で報告されています<sup>33</sup>。

シース液には、質量校正用のリファレンスマスや APPI によるイオン化を補助する添加物を低濃度で含めることもできます。

## 推奨されるシース液

一般的なシース液は、揮発性有機酸または塩基の水溶液と、メタノールやイソプロパノールなどの有機溶媒の 50:50 混合液からなります。これらの溶媒により、スプレーの形成が促進されます。シース液でアセトニトリルを使用することは推奨しません。特に高濃度のアセトニトリルに長時間さらされると、フューズドシリカ CE キャピラリーの外側のポリイミド保護層が膨張することが観察されています。その結果、ポリイミド残留物によって分離キャピラリーが詰まり、この詰まりによりスプレーの形成が妨げられ、最終的にはアセトニトリルにさらされたスプレーヤー内のフューズドシリカキャピラリーが破損する可能性があります。

また、アセトニトリルは非プロトン性溶媒のため、プロトン化が補助されず、シース液でアルコールを使用した場合よりも記録される信号強度が低くなります。

CE/MS でカチオンを検出する場合は、シース液でギ酸や酢酸などの低分子量の有機酸を使用します。また、CE/MS でアニオンを検出する場合は、水酸化アンモニウムや 3 級アミンをシース液に適用します。この他、シース液には、低 pH、中性 pH、または高 pH 緩衝用に酢酸アンモニウムやギ酸アンモニウムなどの揮発性緩衝液を含めることもできます。表 2 に、推奨されるシース液の概要を示します。

表 2. 推奨されるシース液の概要

分子電荷	推奨されるシース液*
カチオン (ポジティブ ESI)	以下を含む 50 % メタノールまたはイソプロパノール: 0.1 ~ 1 % のギ酸または酢酸 5 ~ 20 mM のギ酸アンモニウムまたは酢酸アンモニウム
アニオン (ネガティブ ESI)	以下を含む 50 % メタノールまたはイソプロパノール: 5 ~ 20 mM のギ酸アンモニウムまたは酢酸アンモニウム/メタノールまたはイソプロパノール 1:1 0.1 ~ 1 % の水酸化アンモニウム/メタノールまたはイソプロパノール 1:1**
備考	* 溶媒は、pH が低いものから順に記載されています。 ** 水酸化アンモニウム溶液は、アンモニアが蒸発して pH が変化する可能性があります。 そのため、一般にはシース液を毎週新しく調製することを推奨します。

TOF または Q-TOF 質量分析計でリファレンスマスを使用する場合は、シース液にリファレンスマス化合物を追加できます。アジレントは、リファレンスマスとしてアジレントのリファレンスマス混合液 (p/n G1969-85001) のプリンおよび HP-0921 を使用することを推奨します。それぞれを、シース液で使用するメタノール溶液に追加してください。

特に APPI を使用する場合は、容易に光イオン化して分析分子をイオン分子反応によりイオン化できる物質をシース液に追加します。このような添加物はドーパントと呼ばれ、例えばアセトンやアニソールがこれに該当します。

## シース液の送液

前述のとおり、シース液は 1 ~ 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  の低流量で送液します。一般に、ESI のイオン化は濃度に比例することが多くの研究グループから報告されています。すなわち、ピーク面積はシース液の流量に反比例するため、シース液の流量はできる限り低く設定します。経験上、シース液の流量は 4 ~ 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  が最適であると考えられています。シース液の流量をこれより高くすると、溶質の希釈率が高くなり、感度が低下します。

例えば、5  $\mu\text{L}/\text{min}$  の体積流量が EOF の 50 ~ 100 倍であるとする、CE 分離キャピラリーから離れる際に溶質の濃度は 50 ~ 100 倍に希釈されることになります。ただし、実際には、(ESI に) 適した組成のシース液を使用することで、この希釈による影響をある程度弱めることができます。

一般的なシース液の流量は、ナノ流量での分離に優れた CE/MS には高すぎます。実際に、最大感度を示すナノエレクトロスプレーイオン化のプロセスは、50 nL/min 以下のナノ流量によって成り立ちます。

同軸シース液送液の利点を以下にまとめます。

- CE および ESI 電圧共通の接地接続を持つスプレー管との安定した湿式電気接続を提供
- 電気浸透流の存在や大きさは関係なくスプレーを形成
- スプレーの形成に最適な条件、すなわち希釈効果が低減されるようにシース液の組成を選択可能
- ガス圧支援により安定したスプレーを実現
- (脱) プロトン化、誘導体化、電荷移動 (APPI) などスプレー内での化学反応や、質量較正用標準物質の供給が可能

アジレントは、シリンジポンプではなく、Agilent 1260 Infinity II アイソクラティックポンプ (図 3 および図 4 を参照) を使用したスプリットフローでシース液を送液することを推奨します。シリンジポンプでも、必要な流量を (より低コストで) 送液できるものと思われそうですが、シリンジポンプでは許容できる流量安定性が得られず、MS 検出時に過度のノイズやゴーストピークが現れることが経験からわかっています。また、1260 Infinity II アイソクラティックポンプではシース液の脱気が行われ、長時間の自動運転も可能です。

## 9.9

### 動作パラメータ - ネブライザ ガス圧、ドライガス温度、流量

第6章「液相分離と質量分析の連結」で説明したとおり、スプレー形成プロセスのガス圧支援は、安定性と堅牢性の高いスプレーを得るために重要です。実際には、ネブライザガス流により、キャピラリー出口に向かう流体流れが生じ、CE キャピラリー内の液体を吸い出すわずかな力が働くことが、複数の研究グループにより確認されています<sup>34, 35</sup>。キャピラリー内では、流体流れによって放物面状の溶媒流速プロファイルが形成されますが、これによってゾーンがさらに広がり、分析成分ゾーンの効率が低下することが観察されています。

この効果を最小化し、またサンプルおよびBGE バイアルの操作中にキャピラリーが空になることがないように、予防措置を取る必要があります。

例えば、注入側バイアルに負圧をかけて、流体流れを低減することができます。実際には、UV 検出で測定されるピークの効率が再確立されるまで、また EOF が元の値に戻るまで、負圧を 10 mbar 刻みで増加させます<sup>36</sup>。

内径 50  $\mu\text{m}$  以下の細いキャピラリーを用いたり、より長いキャピラリーを使用することにより、この効果は低減します。また、注入プロセス中は、気泡が引き込まれないように、ネブライザガスの流量を低くすることを推奨します。

時間プログラムにより、CE サンプルの注入プロセス中はネブライザガス圧を低減することを推奨します。

イオンソースでの蒸発プロセスを補助するために、MS からスプレーに向かって加熱ガスが供給されます。これはドライガスで、通常は 100 ~ 200 °C です。ここで、低流量のときは、ドライガスの流量が高すぎるとスプレーの微細な噴霧が不安定になるため、ドライガスの流量を低い値に設定する必要があることに注意してください。

## 9.10

### エレクトロスプレーイオン化電圧

三重管構造のスプレーヤーは接地されているため、エレクトロスプレーイオン化のための電圧は、質量分析計から供給されます。すなわち、スプレーヤーから吐出された正電荷イオンを分析するときは、エレクトロスプレー電圧を負値 (ESI-Positive) に設定する必要があります。一方、スプレーヤーから吐出された負電荷イオンを分析するときは、電圧を正值 (ESI-Negative) に設定します。

実際には、システムで陽イオンまたは陰イオン検出モードを選択する必要があります。エレクトロスプレー電圧がスプレーニードルに印加される LC/MS または CE/MS システムでは、設定する電圧の符号が逆になることに注意してください。すなわち、エレクトロスプレー電圧は、陽イオンを質量分析するときには負になり、陰イオンを分析するときには正になります。

この構成でもう 1 つ重要になるのが、MS インレットキャピラリーの材料です (図 6 を参照)。アジレントの質量分析計では、MS を ES 電圧から絶縁するために、このキャピラリーはガラスでできています。それ以外の場合は金属製です。

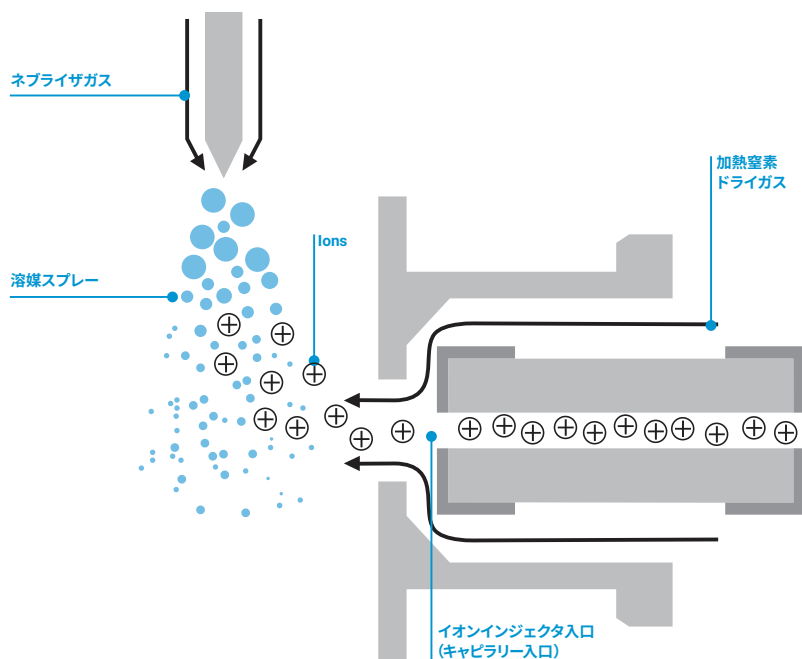


図 6. ドライガスの役割

# パート 2 CE/MS の実際

パート 2 は CE/MS の実践に焦点を当てます。ソフトウェア設定などの一般的な構成から始まり、アジレントの三重管構造のスプレーヤーの取り付けに関する詳細なセクションを含む章へと続きます。

最後のセクションでは、CE/MS メソッド例とメンテナンス、トラブルシューティングのガイドラインを取り上げます。

## 10 CE/MS の実際

Agilent 7100 キャピラリー電気泳動装置は、アジレントの飛行時間型、トリプル四重極、四重極飛行時間型シリーズの LC/MS システムと連結できます。図 7 に、代表的なシステム例を示します。

Agilent InfinityLab LC/MSD シリーズシステムは、OpenLab CDS 用 CE (M8501AA) および MS (M8361AA) ドライバが実装された Agilent OpenLab CDS (ChemStation Edition) ソフトウェア (M8301AA) で制御します。アジレントの他の質量分析システム (6200、6400、6500 シリーズシステム) は通常、Agilent MassHunter ソフトウェアで制御されます。

以降の段落では、7100 CE 装置と 6000 シリーズ LC/MS システムの設定や接続に関する共通事項と個別の事項を詳細に説明します。ここでは、流体および電気接続を視覚化するために、Agilent InfinityLab LC/MSD シリーズシステムを例に挙げ、図で示しています。アジレントの飛行時間型、トリプル四重極、四重極飛行時間型シリーズ LC/MS システムでの実際の状況とは異なりますが、本質的な違いではありません。

Agilent InfinityLab LC/MSD シリーズシステムと OpenLab CDS (ChemStation Edition) ソフトウェアでの構成は MassHunter CE/MS システムでの構成と大きく異なるため、その設定は別の章で説明します。

- 11 章「Agilent CE/MS システムの一般的な設定」
- 12 章「Agilent OpenLab CDS (ChemStation Edition) ソフトウェアによる Agilent CE/MS システムの設定」
- 13 章「Agilent MassHunter ソフトウェアによる Agilent CE/MS システムの設定」



図 7. Agilent 7100 キャピラリー電気泳動システムと Agilent G6495B トリプル四重極 LC/MS システム

7100 CE システムと Agilent InfinityLab LC/MSD、飛行時間型、トリプル四重極、四重極飛行時間型シリーズ LC/MS システムの初期設定については、ここでは説明しません。これらの設定については、7100 CE システムのユーザーガイドや個々の 6000 シリーズ LC/MS システムのインストールガイド（アジレントのウェブサイト [www.agilent.com](http://www.agilent.com) で資料番号を確認できます）などの別のドキュメントに詳細に記載されています。

アジレントのサービスエンジニアまたはアジレント認定サービスプロバイダによる Agilent CE/MS アダプタキットおよび CE/MS スプレーキットの取り付けを予定されている場合は、14 章「キャビラリーおよび CE/MS カセットの取り付け」に進んでください。

7100 CE システムを他社製の質量分析計に接続するために必要なすべてのアクセサリと文書については、各プロバイダの責任となるため、このガイドでは提供しません。

# 11 Agilent CE/MS システムの一般的な設定

## 11.1

### CE および MS 機器のレベリング

CE/MS システムの設定時、2 台の機器設定を接続する分離キャピラリーの長さを最も短くするために、2 台をできるだけ接近させてに配置する必要があります。Agilent CE を高さ調整が可能なカートに配置することで、位置の調整や HPLC システムへの切り替えが容易になります (図 8)。

一般的に、キャピラリー注入口のバイアルのバッファレベルは、キャピラリー出口のバイアルのバッファレベルと等しくし、サイホン効果を回避する必要があります。7100 CE 装置では、注入口バイアル内のキャピラリーの終端はベンチレベルより 365 mm 高くなります。バッファが満杯時の高さ 15 mm を追加すると、トータルの高さは 380 mm になります。三重管構造のスプレーヤー内の出口キャピラリーの終端は、注入口のバイアル内のバッファレベルと同じ高さにする必要があります。この終端が注入口バイアルよりも低くなると、サイホン効果により出口へ向かう流れが発生します。逆に、スプレーヤー内のキャピラリーの高さが注入口バイアル内のバッファレベルよりも高いと、キャピラリーが空になります。

7100 CE 装置と Agilent InfinityLab LC/MSD シリーズを同じベンチに配置すると、スプレーヤー内の出口キャピラリーの終端は注入口のキャピラリーの終端よりも 70 mm 低くなります。MS でのベンチ高よりも低く、高さを調節できるカートやテーブルにより、レベル合わせのための設定が容易になります。あるいは、MS をベンチ上で 70 mm 高くします。

他の Agilent LC/MS モデルでは、スプレーヤーの高さが異なる場合があります。これを図 9 に示します。

7100 CE 装置のカバーの右側には T 字型の印があります (図 10)。これは電極の高さの位置を示すもので、調整用の基準として利用できます。



図 8. CE 装置のシンプルな高さ調整が可能なフレキシブルデスク (ionBench BCHLC4575)。写真提供: ionBench (3 route de Chamvres, 89300 Joigny, France)

MS モデル		G7100 との 高さの差 X [mm]
SQ	G6125BA、 G6135BA	70
TOF	6230	26
QTOF	G6500 シリーズ	55
QQQ	G6400 シリーズ	55

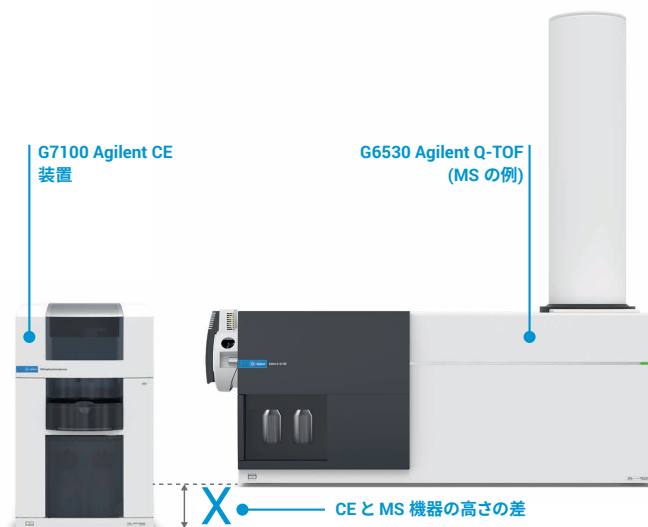


図 9. Agilent LC/MS 機器のベンチレベルからのスプレーの高さ

## 11.2

### 7100 CE 装置の CE/MS

#### 出口の準備

7100 CE 装置には下向きにスライドできる可動式のキャップ（またはラッチ）が外面の右側にあります（図 10）。ユーザーは開口部から CE/MS キャピラリーカセットを取り付けできます。

機器を準備するには、次の手順に従ってください。

1. 機器のふたを開けます。
2. 可動式のキャップ（またはラッチ）をわずかに内側に曲げます。
3. 機械的に止まるまで、キャップ（またはラッチ）を下向きにスライドします。

注: 機器から可動式のキャップ（またはラッチ）を取り外さないように注意してください。

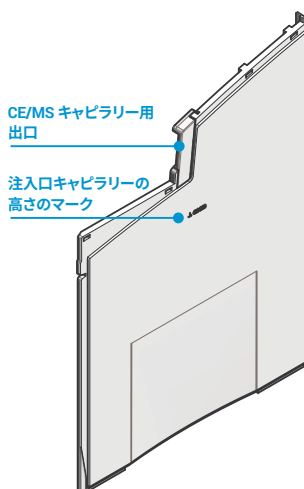


図 10. Agilent 7100 CE 装置の右側

## 11.3

### 7100 CE 装置の背面パネルでの 接続

#### 接地ケーブルの取り付け

両方の機器を共通接地に接続するためのケーブルが CE/MS アダプタキットに含まれています。

1. ケーブルラグの付いた片端を 7100 CE 装置の後ろ側にある電子ボックスのネジに接続します (図 11)。
2. ワニ口クリップの付いたもう一方の端を、イオンソースまたは取り付けられた ESI スプレアの金属部分に接続します。

#### Agilent InfinityLab ポンプへの CAN 接続の確立

1. CAN ケーブルを 7100 CE 装置の後ろ側にある電子ボックスの CAN スロットに差し込みます (図 11)。
2. アイソクラティックポンプを近くに配置し、その CAN スロットに CAN ケーブルのもう一方の端を接続します。

注: CE 装置の LAN アダプタスロットと CAN アダプタスロットを間違えないようにしてください。接続を間違えると電子部品が損傷する恐れがあります。

#### MS 機器へのリモート制御接続の確立

1. リモートスタート制御ケーブルを 7100 CE 装置の後ろ側にある電子ボックス (図 11) の Remote とラベルの付いた該当するスロットに差し込みます。
2. リモートケーブルのもう片端を MS 機器 (図 12、他の 6000 MS シリーズと類似) の該当するスロットに接続します。

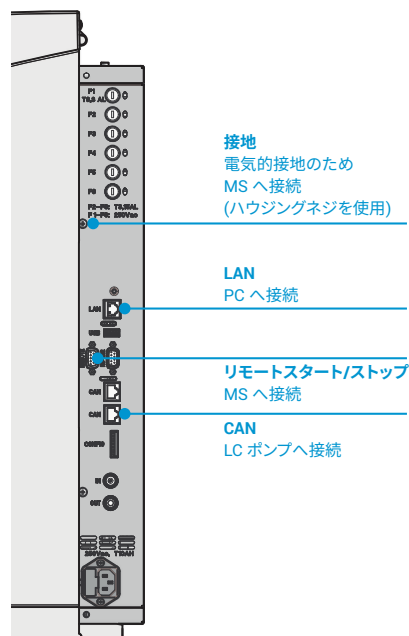


図 11. Agilent 7100 CE 装置の背面の接続部

## CE/MS システムの LAN 通信の準備

一般的に、CE/MS システムを制御する PC には 2 枚の LAN カードがあります。1 枚は 7100 CE 装置の制御用です。多くの場合、もう 1 枚のカードでコンピュータをローカルエリアネットワークに接続します。

1. LAN ケーブルを 7100 CE の後ろ側にある電子ボックス (図 11) の LAN ラベルが付いた該当するスロットに差し込みます。
2. LAN ケーブルを MS 機器 (図 12) の該当するスロットに差し込みます。
3. これら 2 本の LAN ケーブルをネットワークハブに接続します。
4. ネットワークハブを制御用 PC の該当する LAN カードに接続します。

次に示す IP アドレスをデフォルトのアドレスとしてセットアップで使用します。例えば BootP サービスを使用する際など、設定が異なる場合は該当するインストールを参照してください。

MS のデフォルト IP アドレスは 192.168.254.12 です。

CE のデフォルト IP アドレスは 192.168.254.11 です。

PC のデフォルト IP アドレスは 192.168.254.1 で、サブネットが 255.255.255.0、ゲートウェイが 192.168.254.1 (これは取り込み用 PC 内の 2 枚目の LAN カードで、リカバリイメージ上で事前構成されます) です。

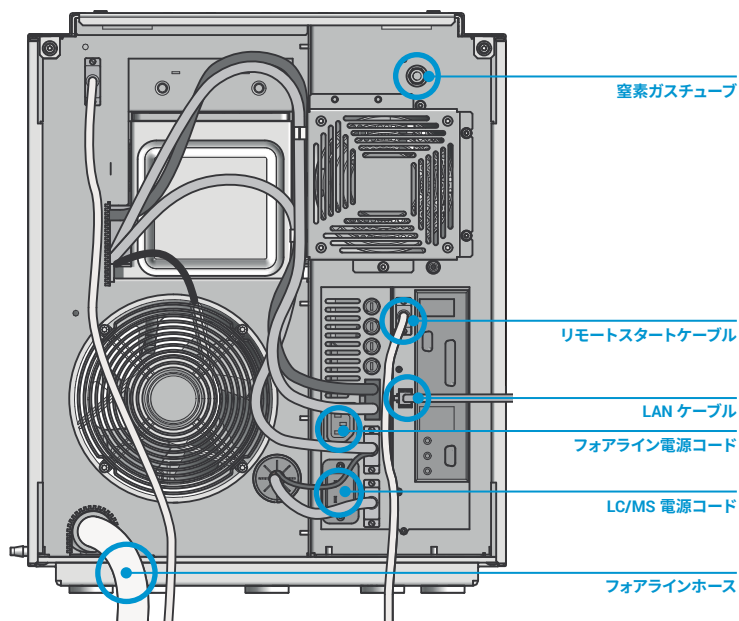


図 12. Agilent InfinityLab LC/MSD システムの背面の例  
(MS ユーザーマニュアルを参照)

# 12 Agilent OpenLab CDS (ChemStation Edition)

## ソフトウェアによる Agilent CE/MS システムの設定

この章では、OpenLab CDS (ChemStation Edition) ソフトウェアを使用した Agilent CE/MS システムの設定について詳細に説明します。7100 CE 装置とアジレントの飛行時間型、トリプル四重極、四重極飛行時間型シリーズの LC/MS システムとの組み合わせの詳細については、13 章「Agilent MassHunter ソフトウェアによる Agilent CE/MS システムの設定」を参照してください。

### 12.1 Agilent CE/MS ChemStation ソフトウェアアドオンモジュールの インストール

CE/MS 用 OpenLab CDS (ChemStation Edition) ソフトウェアは、PC と併せて注文することも、他の PC で使用するために個別に注文することも可能です。アジレントから PC バンドルとして購入していない場合は、ChemStation のインストールガイドまたは Agilent InfinityLab LC/MSD シリーズシステムのインストールガイドに記載された手順に従ってください。Agilent CE/MS ChemStation ソフトウェアでは、7100 CE 装置の制御、CE/MS メソッドの管理、CE/MS 分析用シーケンスの設定、CE/MS データの取り込み、データ解析の実行が可能です。

次の手順は、OpenLab CDS (ChemStation Edition) ソフトウェアを設定するためのインストール、構成、ライセンス取得の各ステップを説明します。

1. システムに付属のソフトウェアメディアからアプリケーションを実行してソフトウェアをインストールします。
2. システム構成チェッカーを実行します。
3. OpenLab CDS インストールウィザードを実行します (製品を選択してインストールする場合は、必ず I/O ライブラリを含めてください)。
4. Agilent.Subscribenet.com に接続し、認証コードを使用して各ライセンス番号を取得します。

各ライセンス番号は、インターネットアドレス (Agilent.Subscribenet.com) を使用してアクセスできる SubscribeNet で提供されます。CE/MS をインストールする場合、I/O ライブラリがインストール済みであることが必要です。CE/MS のインストールが完了すると、機器エディタが表示されます。

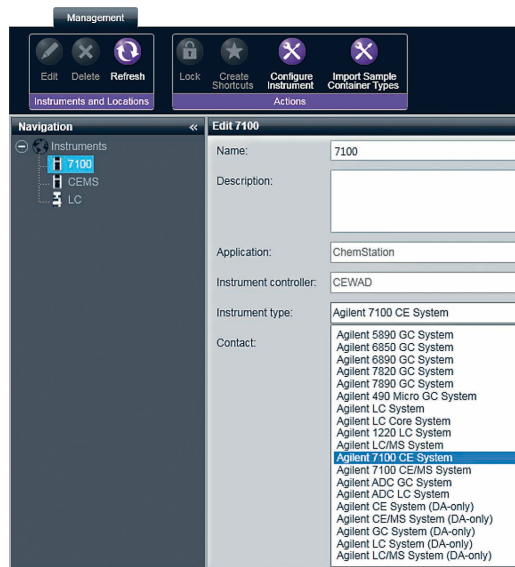


図 13. Agilent OpenLab CDS C.01.x (ChemStation Edition) の機器の構成画面

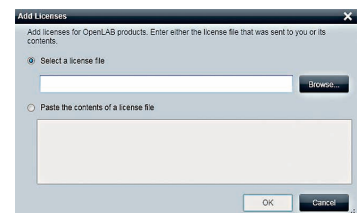


図 14. ライセンス設定画面 (Agilent.SubscribeNet.com)

## 12.2 1260 Infinity II アイソクラティック ポンプの構成

ポンプを CAN ケーブル経由で 7100 CE 装置に接続する場合は、自動構成を使用するか、構成エディタでポンプを選択して追加することによって、ChemStation でポンプを構成できます。自動構成を推奨します。

1. OpenLab コントロールパネルから、「Configure Instrument (機器の構成)」を選択します。
2. 「Configure Instrument (機器の構成)」画面に移動します (図 15)。この画面は ChemStation の起動中に自動的に表示される場合もありますが、「Instrument (機器)」メニューから「Instrument configuration (機器構成)」を選択して表示しなければならない場合もあります。7100 CE 装置の IP アドレスは自動的に設定されます。
3. 表示結果が図 15 のようになっているかを確認します。この例では 4 個のモジュール (CE、DAD、アイソクラティックポンプ、MSD) が構成されています。
4. 機器セッションを立ち上げます (オンライン)。

**注:** DAD を後で ChemStation ユーザーインターフェースから削除する場合も、必ずシステムで DAD を構成に含めてください。詳細については、[セクション 17.3 「DAD を使用しない CE/MS 分析メソッドの設定」](#)を参照してください。

オプション: 構成エディタからアイソクラティックポンプを選択して追加する場合は、次の手順に必ず従ってください。

5. 「Configurable Modules (構成可能なモジュール)」リストで IsoPump アイコンを選択します。図 17 を参照してください。
6. 矢印をクリックして、モジュールを「Selected Modules (選択したモジュール)」に移します。
7. 「Selected Modules (選択したモジュール)」リストの IsoPump アイコンを選択します。
8. 「Configuration (構成)」をクリックします。
9. 「Communication (構成)」の下に、ポンプのシリアル番号を入力します。
10. 「OK」をクリックします。

「Instrument (機器)」>「Instrument configuration (機器構成)」メニューを使用して構成の編集を始めた場合は、設定を有効にするために ChemStation のオンラインコピーを閉じて再起動する必要があります。「Instrument (機器)」>「More CE (CE の詳細)」>「Instrument configuration (機器構成)」を選択した場合は、ChemStation を再起動せずに機器モードを変更するオプションがあります。

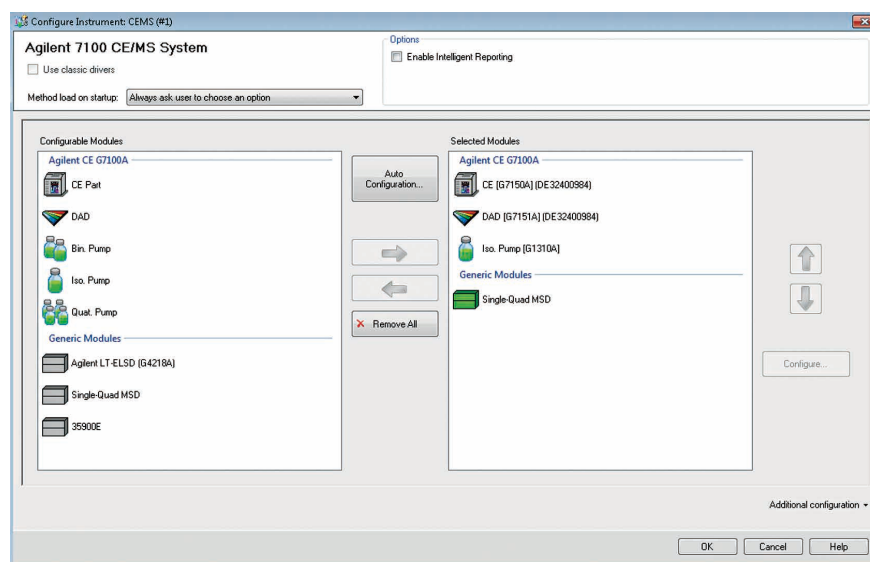


図 15. Agilent 7100 CE/MS システム構成

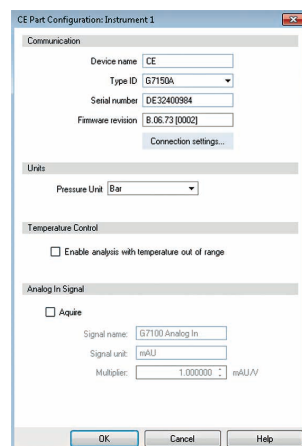


図 16. Agilent 7100 CE 装置の構成

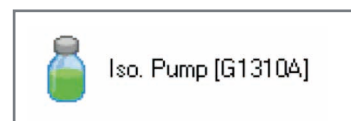


図 17. 「Configurable Modules (構成可能なモジュール)」リストの IsoPump アイコンを選択

## 12.3

### MS の構成

1. 構成エディタで「Single-Quad MSD (シングル四重極 MSD)」を選択します。図 18 を参照してください。
2. 「Configure Selected Module (選択したモジュールの構成)」ダイアログで OK をクリックして所定の IP アドレスを許可します。
3. 構成エディタを閉じます。
4. 次回からこの機器のオンライン ChemStation を開始すると、MSD 構成ダイアログが表示されます。図 19 を参照してください。
5. 「Configured Modules (構成したモジュール)」リストで、デフォルトのモジュールを選択して「Remove (削除)」をクリックします。
6. 「Available Modules (使用可能なモジュール)」リストで、使用する機器モデルを選択して「Add (追加)」をクリックします。
7. 「OK」をクリックします。

機器を起動する方法、温度と真空を平衡化する方法、最初の CE/MS 実験の前にオートチューニングする方法についての詳細は、MS のマニュアルを参照してください。

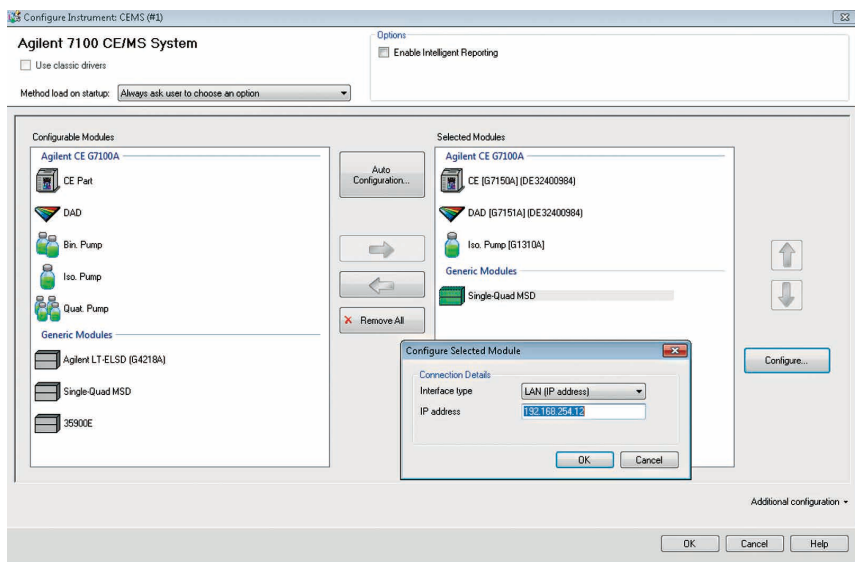


図 18. 構成エディタで「Single-Quad MSD (シングル四重極 MSD)」を選択

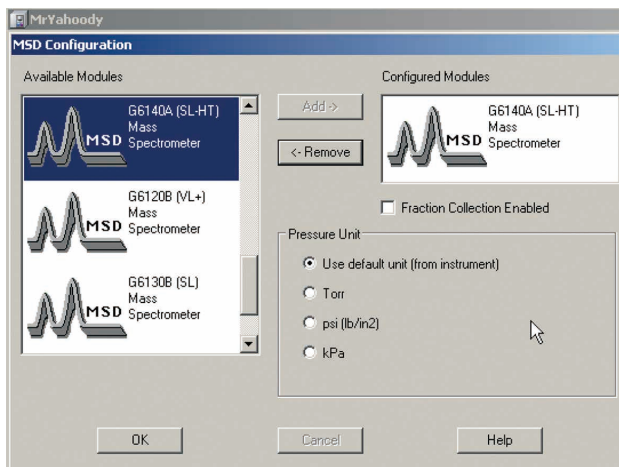
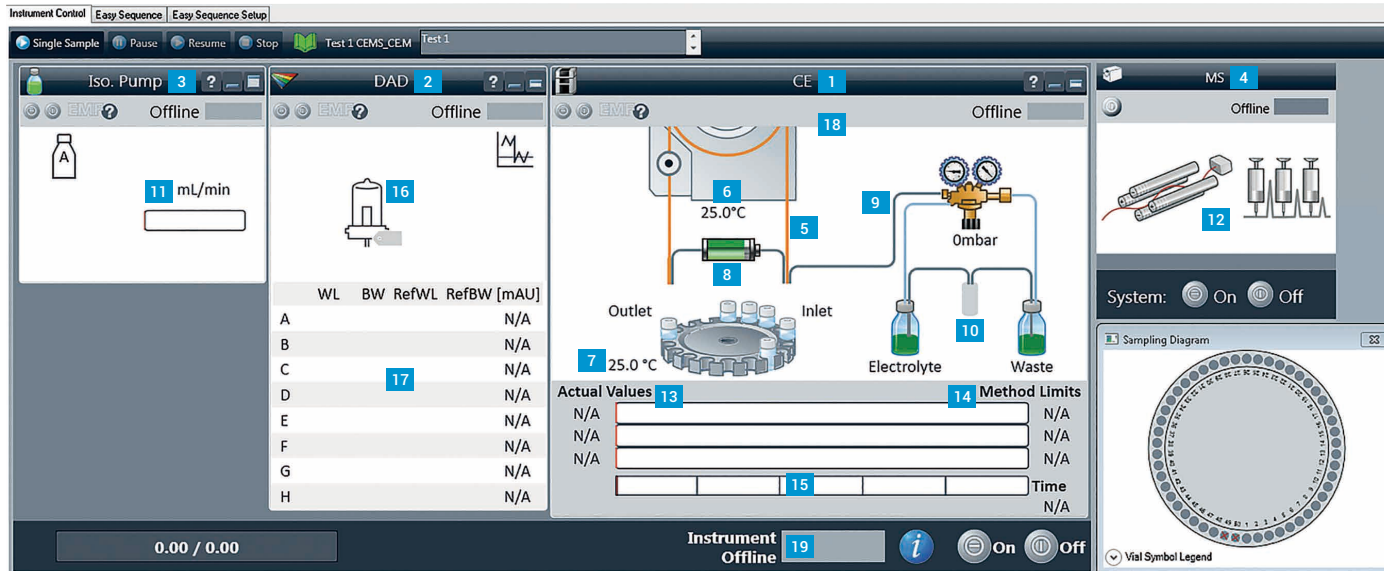


図 19. MSD 構成

12.4  
グラフィカルユーザー  
インタフェースの説明

Agilent CE/MS システム内の CE 装置のコアコンポーネントが、CE コントロール図 (ダッシュボード) に表示されます。図 20 を参照してください。DAD、ポンプ、MS など、CE/MS システムの他のコンポーネントはすべて、それぞれ個別の図に表示されます。現在の分析モードが CE コントロール図の一番上の行に表示されます。機器の構成で選択できる分析モードは、CE、CE+p、CEC、CE/MS です。「Instrument (機器)」>「More CE (CE の詳細)」>「Instrument Configuration (機器構成)」を選択して、機器の現在の CE モードを変更できます (図 20 を参照)。



- |                  |                 |                 |
|------------------|-----------------|-----------------|
| 1 CE コントロール図     | 8 高電圧電源         | 15 メソッドのステップと進行 |
| 2 DAD コントロール図    | 9 内部圧力          | 16 D2 ランプ       |
| 3 アイソクラティックポンプ   | 10 補給ステーション     | 17 検出器の波長/スペクトル |
| 4 MS             | 11 現在のポンプの値     | 18 機器のモード       |
| 5 注入口リフト/ロードバイアル | 12 MS パラメータアクセス | 19 機器全体の状態      |
| 6 カセットの温度        | 13 現在の電氣的値      |                 |
| 7 トレイ/トレイ温度      | 14 メソッドの電氣パラメータ |                 |

図 20. CE/MS システムと CE、DAD、ポンプ、MS のユーザーインタフェース

## 12.5

### CE モードの設定

上記で説明した構成とは異なり、他の CE モード、例えばノーマル CE モード（ゾーン電気泳動用など）、CE+p（ゲルアプリケーション用）、CEC などで分析する場合も考えられます。この場合、7100 CE の「Configuration（構成）」メニューに移動して ChemStation を再起動し、設定を有効にする必要はありません。図 15 を参照してください。「Instrument（機器）」>「More CE（CE の詳細）」>「CE Configuration（CE の構成）」で構成選択ダイアログに移動でき、ChemStation の再起動は不要です（図 21 を参照）。

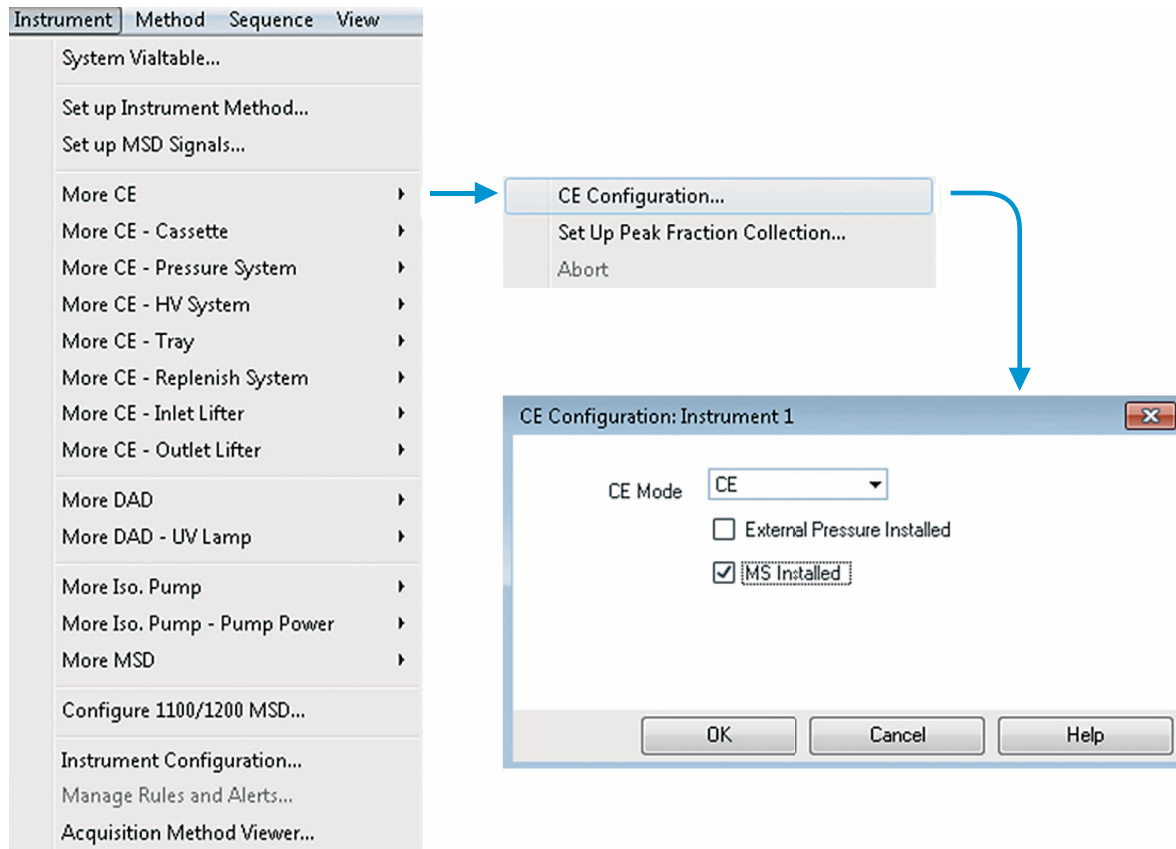


図 21. CE モードの構成の選択

## 13 Agilent MassHunter ソフトウェアによる Agilent CE/MS システムの設定

Agilent 7100 CE 装置のドライバは、TOF/QTOF 用バージョン B.05.01 以降および QQQ 用 B.06.00 以降の Agilent MassHunter ソフトウェアに統合されています。CE/MS システム全体の構成は「Configuration (構成)」ツールから実行できます。

1. 「スタート」>「すべてのプログラム」>「Agilent」>「MassHunter Workstation」>「Acq Tools (取り込みツール)」>「Instrument Configuration (機器構成)」の順にクリックします。
2. 「Instrument Configuration (機器構成)」画面 (図 22 を参照) で、次のことを実行します。
  - a. 機器の名前を変更する場合は、「Instrument name (機器名)」に新しい名前を入力します。
  - b. 「Mass Spectrometer (質量分析計)」チェックボックスを選択します。
  - c. MS 機器のオプションをクリックします。
  - d. 「Agilent LC (1100/1200/1260/1290) / CE」チェックボックスを選択します。
  - e. 「Agilent CE System Access (Agilent CE システムアクセス)」をクリックします。
  - f. 「Device Config (装置構成)」をクリックして CE システムを構成します (図 23 を参照)。
  - g. 「OK」をクリックします。
3. 構成が完了したら、「OK」をクリックします。

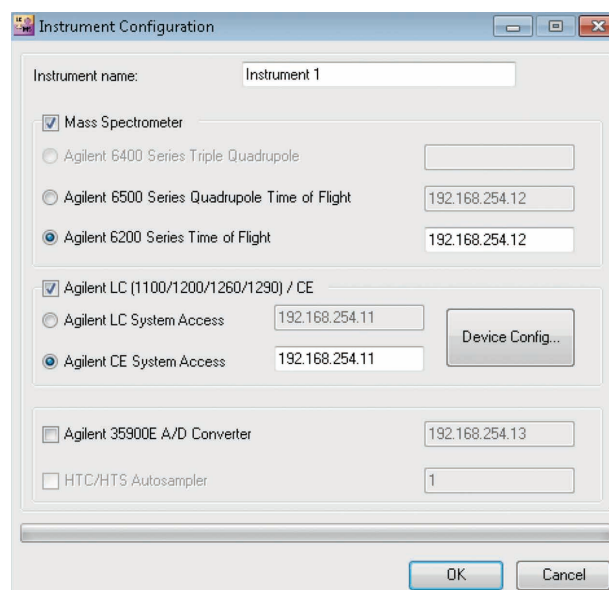


図 22. 「Instrument Configuration (機器構成)」画面

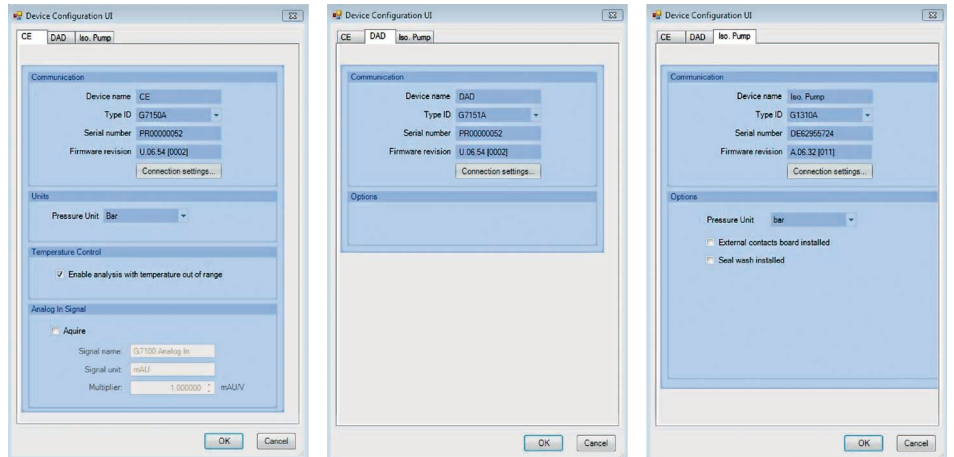


図 23. CE 装置、DAD、アイソクラティックポンプの「Device Configuration (装置構成)」の画面

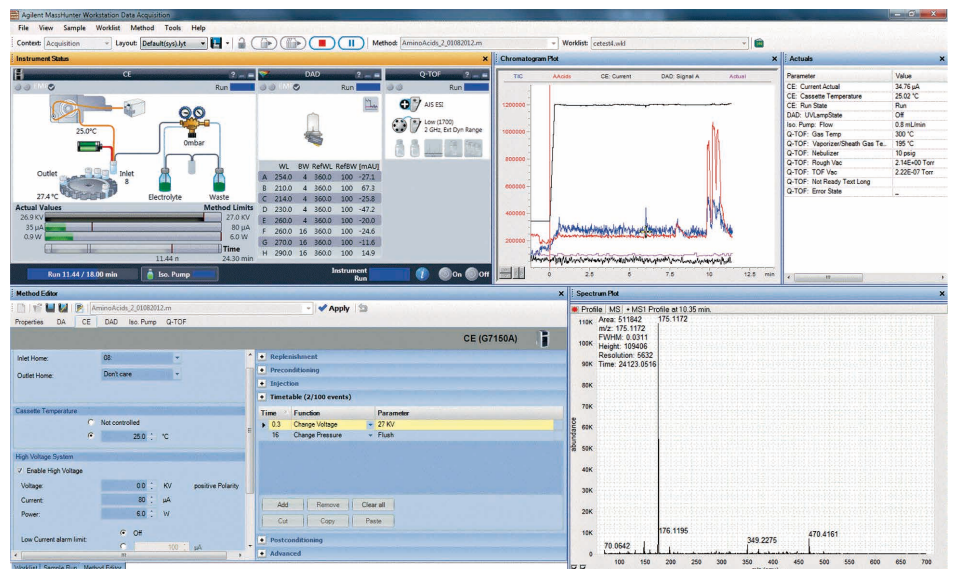


図 24. MassHunter の CE/MS システムのグラフィカルユーザーインターフェース

CE 装置のグラフィカルユーザーインターフェースの設定は、OpenLab CDS (ChemStation Edition) のものと同じです (図 24 を参照)。Method Editor からアクセスできるメソッド設定画面も同一です。TIC、EIC、UV-トレースなどの CE および MS シグナルや、他の外部検出器 (例えば LIF) のシグナル、CE 電流や電圧などのパラメータが Chromatogram Plot に表示されます。オンライン MS スペクトルおよび MS 機器や他の LC モジュール (アイソクラティックポンプなど) の設定は、標準 MassHunter LC/MS ソフトウェアで処理されます。

「Tools (ツール)」 > 「Device Configuration (装置構成)」で機器の現在の CE モードを変更できます (図 25 を参照)。

CE/MS ワークリストの実行中に重要となるのは、「Worklist Run Parameter (ワークリスト実行パラメータ)」の「Wait Time for Ready (準備のための待機時間)」の設定です。このパラメータは、各デバイスの注入の準備ができるまでの最長待機時間を分で定義するもので、メソッドの設定値として機器に送られます。

指定した時間内にデバイスの準備ができない場合は、エラーとして分析がストップします。これにより、問題が発生すると、システムは待機状態に戻らなくなります。この値は、キャピラリーのプレコンディショニングに必要な時間全体よりも十分に長い時間を設定しなければなりません。「not ready timeout (準備中のためタイムアウト)」の状態になります。デフォルトでは多くの場合、10 分です。しかし、プレコンディショニングが10 分よりさらに長くなると、システムは正しいエラーメッセージを出さずに停止します。

「Wait Time for Ready (準備のための待機時間)」パラメータを変更するには、次の手順を実行する必要があります (図 26 を参照)。

1. Agilent MassHunter ワークステーションデータ取り込みソフトウェアで、「Worklist (ワークリスト)」 > 「Worklist Run Parameters... (ワークリスト実行パラメータ)」をクリックします。
2. 「Wait Time for Ready (min) (準備のための待機時間 (分))」は、タブ「Page 1 (ページ 1)」の下部の「Run Settings (分析の設定値)」にあります。
3. 必要な値を入力します。
4. 「OK」をクリックします。

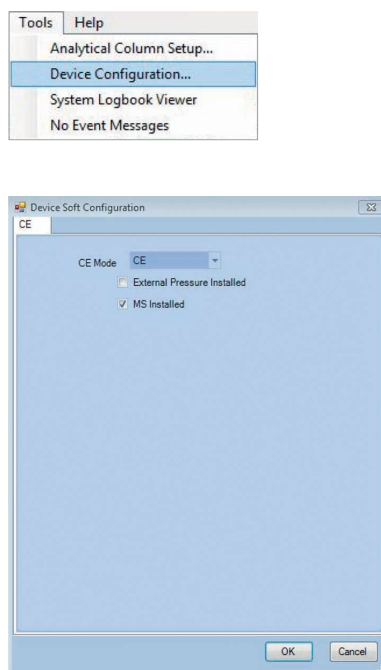


図 25. CE モードの構成の選択

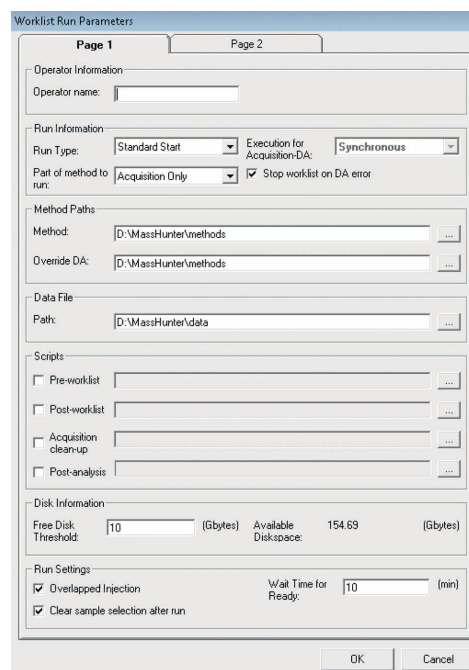


図 26. 「Worklist Run Parameters (ワークリスト実行パラメータ)」画面

## 14 キャピラリーおよび CE/MS カセットの取り付け

### 14.1

#### キャピラリーの準備

CE/MS 用の内径 50  $\mu\text{m}$ 、長さ 125 cm の未修飾フューズドシリカキャピラリーは、アジレントから購入できます（部品番号 G1600-67311、パックあたり 2 本）。このキャピラリーは UV ウィンドウ（UV 検出を MS と併用）付き、UV ウィンドウなし（MS のみで分析）の選択が可能です。Agilent CE/MS キャピラリーは、ポリイミドコーティングがキャピラリーの両端で除去されています。後述する通常の初期のアルカリ性コンディショニングステップを除き、多くの場合、キャピラリーはそのまま使用できます。しかし、分析時間の短縮と DAD 検出器のスキップという 2 つの理由から、キャピラリー長に変更を加えることが望ましい場合があります。

分析時間をより短くするために、アジレントの質量選択検出器へのキャピラリー接続を短くできます。最短長の約 80 cm を残して、上記の CE/MS キャピラリーの長い終端から最大 45 cm 切断できます。キャピラリーを短くしすぎないように注意が必要です。キャピラリーの長さが短くなるほど、スプレーヤー内でのキャピラリーの取り付けや MS イオンソース内でのスプレーヤーの挿入が困難になります。

また、キャピラリーが短くなるほど電場強度が強くなることに注意が必要です。CE/MS では、通常の CE 条件下よりも DAD が注入口（高電圧）に近付きます。検出器の領域では、材質は電氣的に接地の状態です。つまり、通常の CE 条件と比較すると電圧差（キャピラリー内部から検出器本体まで）が相対的に高く、このため、キャピラリーが損傷するアーク放電のリスクが高まります。分析の開始時に電圧ランプを使用してください。

DAD 検出を行わない場合、UV 検出用ウィンドウのないキャピラリーリール（例えば、160-2650-5、50  $\mu\text{m}$ 、5 m フューズドシリカ）からキャピラリーを目的の長さに切断して使用します。この場合、キャピラリーは DAD 検出部分を通らないため、メソッドの DAD 部分で特別な設定を行います（セクション 17.3 「DAD を使用しない CE/MS 分析メソッドの設定」を参照）。この手法での通常の長さは 70~100 cm です。

## フューズドシリカ分離キャピラリーの切断と準備

ダイヤモンド刃のキャピラリーカッターでフューズドシリカキャピラリーを必要な長さに切断することができます（回転ダイヤモンド刃付き CE カラムカッター、部品番号 5183-4669）。このツールの使用を強く推奨します。

CE キャピラリーの終端が滑らかで平らであることの重要性については、文献にも多く記載されています。拡大鏡で切断部が平滑であることを確認してください。スプレーの形状および安定性は切断の品質に依存します。一般的な切断ツールでは、キャピラリーのコーティングにひだを作り、はぎ取ります。残されたぎざぎざの端は完全なスプレーを妨げ、サンプル成分が付着するリスクになります（図 27）。詳細については、CE カラムカッターに付属するマニュアルを参照してください。

**警告: けがを防ぐため、キャピラリーとカセットを取り扱う際は必ず保護眼鏡を着用してください。**

CE/MS 用キャピラリーの切断の準備に関して詳細に示します。

1. 表面をアセトンで十分に洗浄します。
2. ロック用ホイールを開きます。
3. 刃解除ボタン（赤色の点）を押しながら、キャピラリーを CE カラムカッターに挿入します。
4. ロック用ホイールでキャピラリーを固定します。
5. 刃解除ボタン（赤色の点）から手を放します。キャピラリーに刃が当たります。
6. キャピラリーが切断されるまでホイールを 2～6 回一方方向に回転させて切断します。切断中はキャピラリーに張力を加えないようにしてください。
7. 終端を検査して、切断面が平らで垂直になっていることを確認します。

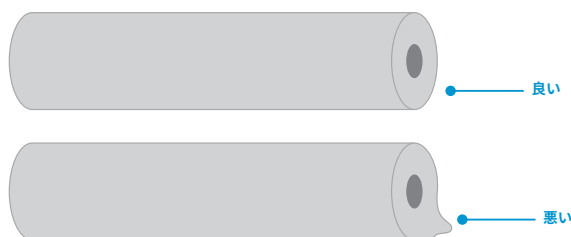


図 27. キャピラリーの切断例

CE カラムカッターを使用できない場合は、次に説明する、単純なツール（セラミックカラムカッター、部品番号 5181-8836、パックあたり 4 個）を使用し、下記の手順に従ってください。

1. わずかに張力をかけた状態で大きな径の表面にキャピラリーを置きます。
2. キャピラリーに対して約 30° の角度でセラミックカッターを当てます。
3. セラミックカッターを強く押し当てながら、エッジがポリイミドを貫通してキャピラリーの断面方向に傷を入れるように引きます。
4. キャピラリーが切断されるまで、キャピラリーを水平方向に引っ張ります。キャピラリーが切断されない場合、ポリイミドが切断されていません。上記の手順を繰り返します。

さらに、分離キャピラリーの注入口および出口側で外側のポリイミドコーティングを除去することが重要です。BGE やシース液に含まれる高含有率の有機溶媒、特にアセトニトリルは、ポリイミドの膨張やキャピラリーの外側からのはがれの原因となります。注入口側では、残ったポリイミドコーティングが狭いサンプルゾーンでの導入を妨げます。出口側では、スプレーヤーの中で、安定したスプレー形成が妨げられることがあります。この結果、感度が低下し、CE および ESI 電流が不安定になります。

ウィンドウエッチングツール（590-3003、酸性処理）を使用するか、またはマイクロトーチで焼いて除去することによって、キャピラリーチップからポリイミドを除去します。焼く場合はフューズドシリカが融解しないように注意してください。内部がコーティングされたキャピラリーを CE 分離で使用する場合、可能な限り燃焼時間を短くしたり、マイクロトーチの使用を控えたりしてください（図 28 を参照）。

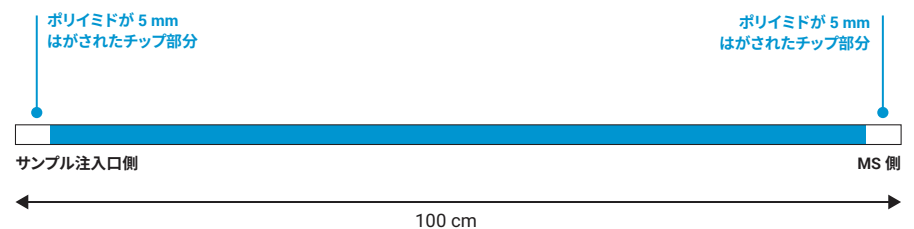


図 28. ポリイミドコーティングをはがした CE/MS キャピラリーの例

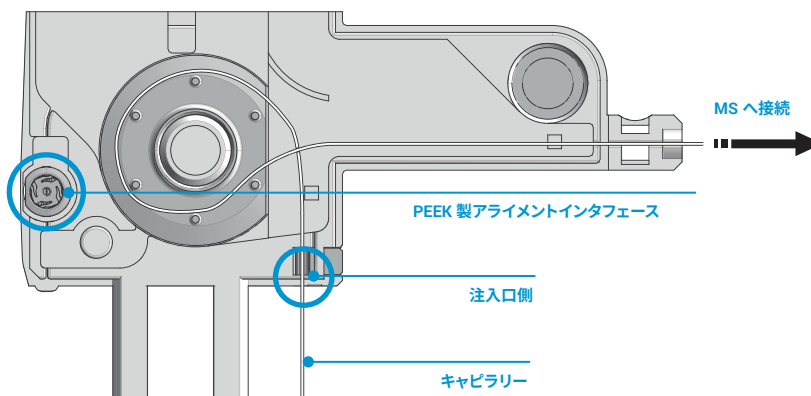
## 14.2

### CE/MS カセットへの キャピラリーの取り付け

セクション 9.4「電場と極性」で説明したように、Agilent CE/MS システム内の DAD 検出ゾーンは標準の CE 動作条件と比べて注入口（高電圧）に近くなっています。検出器部分では、すべての筐体が接地されています。

したがって、CE/MS構成では、電圧差（キャピラリー内部から検出器本体まで）が通常の CE 条件に比べてかなり大きくなります。フューズドシリカは優れた絶縁体ですが、それでもアーク放電のリスクは残っており、これは避けなければなりません。したがって CE/MS 測定時に DAD 検出を同時に行う場合は、絶縁素材である PEEK で作られた光学位置調整アライメントインタフェースを使用する必要があります。CE 単体での DAD 検出で使用される標準の金属製の光学位置調整アライメントインタフェースは使用しないでください。

#### A キャピラリーの取り付け方法 (DAD 不使用)



#### B キャピラリーの取り付け方法 (DAD 使用) (バルクキャピラリーから作られたキャピラリーが使用された例)

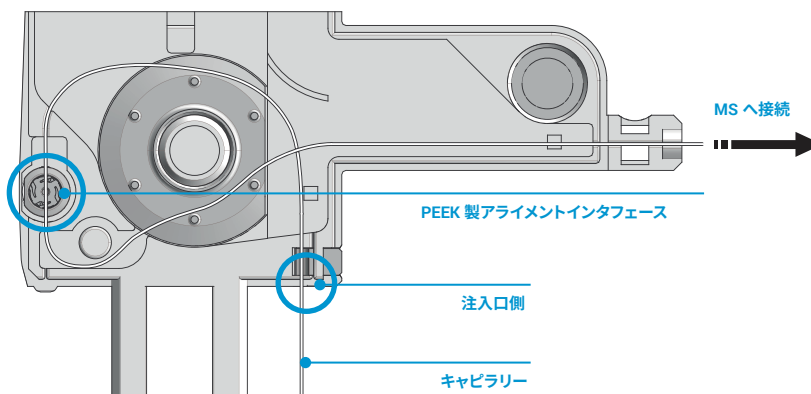


図 29. CE/MS カセットでのキャピラリーの位置

キャピラリーをアライメントインタフェースに挿入する手順、これをカセットに取り付ける手順、カセットを CE に取り付ける手順は、7100 CE システムのユーザーマニュアル（部品番号 G7100-90000）に記載されています。

- 標準の CE モードとは異なり、非金属 (PEEK) アライメントインタフェースが使用されます。
- CE/MS アプリケーションでは専用のキャピラリーカセットが使用され、CE キャピラリーをカセットから外へ出すことができます。
- DAD の使用時、検出点は注入口から 21.6 cm の位置です。
- キャピラリーの全長は MS に十分に届く必要があります。UV 検出を可能にするには、CE 装置を出る CE キャピラリーの全長が 80 cm 以上必要です。

1. UV ウィンドウを通す場合は、図 29B に示すようにキャピラリーを挿入します。あるいは、UV 検出をスキップする場合は、図 29A に示すようにキャピラリーを取り付け、MS 検出器までの全キャピラリー長を短くします。
2. 安全のため PTFE チューブを適切な長さに切断し、CE/MS カセットの終端と MS の注入口の間の外に出ているキャピラリーをカバーします。PTFE チューブをキャピラリーに被せて CE/MS カセット部でしっかりとネジ止めします。
3. CE/MS カセットを通常の CE モードと同じ位置に挿入します。上部のカバーを閉めた後のキャピラリーの長い部分が機器の外側にあって損傷がないことを確認します。

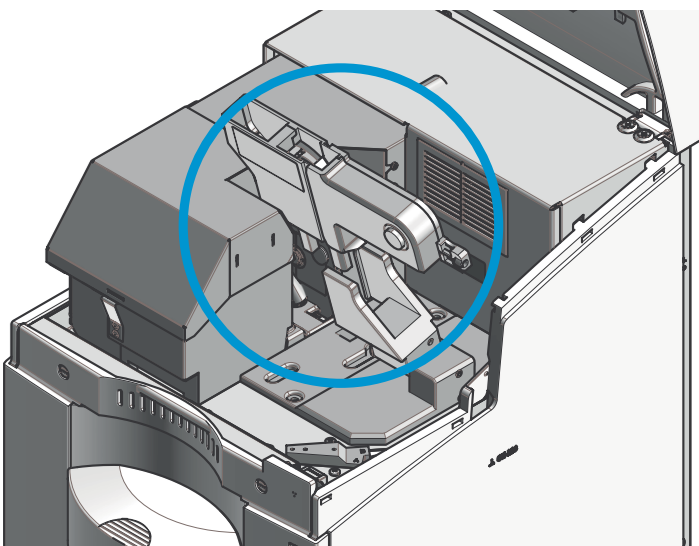


図 30. CE/MS カセットの挿入

## 15 Agilent 1260 Infinity II ポンプおよび真空デガッサの準備

### 15.1

#### シース液送液チューブの接続

ポンプとデガッサを使用する場合は、次の手順を実行する必要があります。

1. 設置手順書に従ってポンプとデガッサ（オプション）を取り付けます。これにより、インフュージョンポンプが不要になります。
2. シースフロープリッタ（Agilent CE/MS スプレーキットに付属）をポンプ出口に接続します。次にセットアップ手順を示します。
3. アイソクラティックポンプにフロープリッタ（部品番号 G1607-60000）を取り付けます。Agilent CE/MS スプレーキットの 2 つのラバープラグ（部品番号 1520-0401）をシートメタルに置きます（図 32）。スプリッタを取り付けるためのネジ（部品番号 0515-0982）を 2 個使用します。
4. ラベル付きポンプチューブをポンプ出口に接続します（図 31）。廃液チューブは、溶媒を再利用するためにシース液ボトルに戻すことができます。
5. Out というラベルの付いたチューブをスプレーヤーから外したままにしますが、先端をビーカーに入れます。これはあとで接続します。
6. ポンプの溶媒ボトル A にシース液を入れます。ボトル A のチューブをデガッサに接続します（図 34）。パージバルブを開き、2 mL/min（100 %A）で 10 分以上ポンプをフラッシュします。流量を 0.4 mL/min に下げた後パージバルブを閉じます。スプリッタは 1:100 でシース液を分割するため、シース液の流量は 4  $\mu$ L/min になります。デガッサを使用しない場合は、使用前にシース液を脱気する必要があり、フラッシュ時間を短縮できます。0.4 mL/min での背圧は約 40 bar です。

### 15.2

#### ポンプパラメータの設定

- 流量: 0.400 mL/min (1:100 フロープリッタ = 0.004 mL/min)
- %B: 0
- アクティブチャンネル: A
- 最大圧力/流量: 400 bar

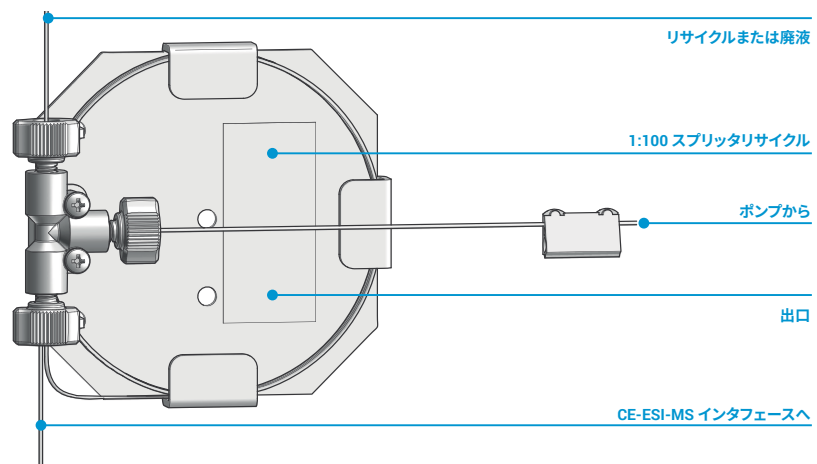


図 31. シースフロースプリッタ

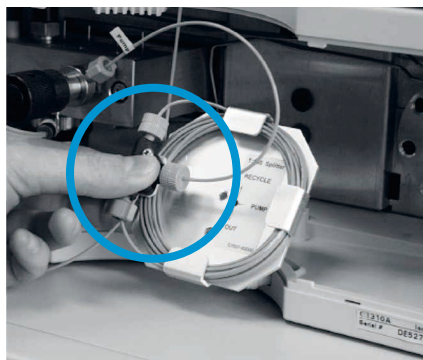


図 32. フロースプリッタの取り付け

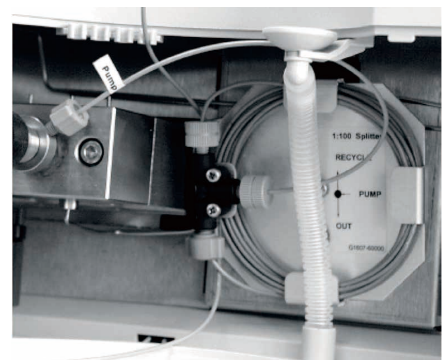


図 33. フロースプリッタの接続

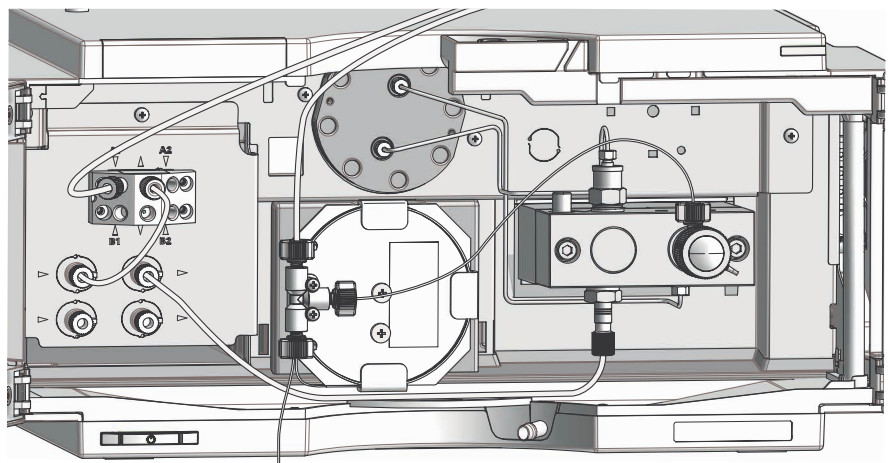


図 34. デガッサ内蔵の Agilent 1260 Infinity II アアイソクラティックポンプにスプリッタユニットを接続

## 16 三重管構造のスプレーヤーの取り付け

16、17、18 章では、Agilent InfinityLab LC/MSD シリーズシステムと OpenLab CDS (ChemStation Edition) ソフトウェアを用いた CE/MS システムの機器コントロールの設定について説明します。アジレントの飛行時間型、トリプル四重極、四重極飛行時間型シリーズ LC/MS システムのイオンソースとデータ取り込みパラメータの設定値の例は、アジレントアプリケーションノートに記載しています。

### 16.1

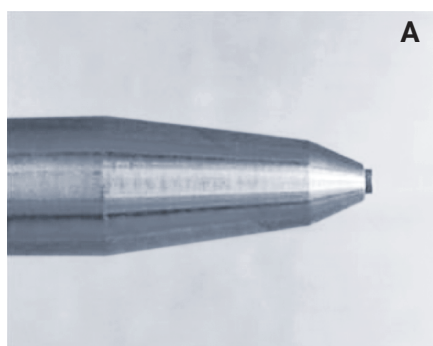
#### CE/MS のイオンソース

ここでは、三重管構造のスプレーヤーに関する重要な情報として、使用するイオンソースに対応できる適切なスプレーヤーについて説明します。アジレントの LC/MS システムではさまざまなイオン化モードを利用することができ (セクション 9.7 「イオン化の種類 - ESI、APCI、APPI」)、過去数年におけるイオンソースの発展の結果として、CE 三重管構造スプレーヤーが利用できるイオンソースに制限があります。表 3 にイオンソースとスプレーヤーの互換性を示します。

図 35 にスプレーヤーの旧バージョン (A) と新バージョン (B) のデザインの違いを示します。

LC/MS システムから CE/MS システムに変更する場合、上記の互換性マトリックスを把握し、適切なイオンソースおよびスプレーヤーを選ぶことが必要です。

標準のスプレーヤー (G1607A)



Agilent Jet Stream と互換性のある  
CE/MS スプレーヤー (G1607B)

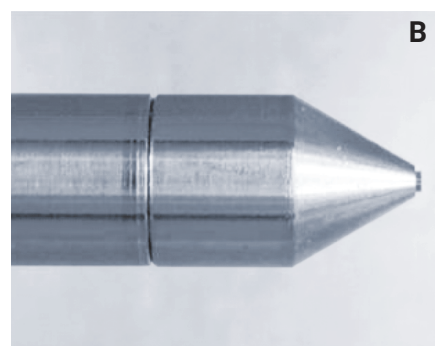


図 35. CE/MS スプレーヤーのバージョン A およびバージョン B

表 3. イオン化モード/イオンソースとスプレーヤーの互換性

イオン化モード/イオンソース	スプレーヤー		コメント
	G1607A	G1607B	
エレクトロスプレー (AP-ESI, G1948B)	あり	あり	
Agilent Jet Stream (G1958A)	なし	あり	G1607A は Jet Stream イオンソースで使用不可
化学イオン化 (APCI, G1947B)	あり	あり	メタルスペーサが必要 (アジレントにお問い合わせください)
光イオン化 (APPI, G1971B)	あり	あり	メタルスペーサが必要 (アジレントにお問い合わせください)
デュアルモードイオン化 (CI+ESI, G1978B)	あり	あり	

## 16.2

### CE/ESI-MS スプレーヤーへの CE キャピラリーの挿入と調整

API エレクトロスプレーイオンソースを取り付ける必要があります。該当する手順書を参照してください。Agilent LC/MS システムでチューニングが適切に完了していることが前提となります。

1. スプレーヤー先端から保護用プラスチックチューブを取り外します。調整ネジを、止まるまで反時計回り (+ 方向) に回します。次に時計回り (- 方向) に 2 回転させます。
2. CE キャピラリー用フィッティングを外し、キャピラリーを挿入します。上下には動くようにキャピラリーをフィッティングネジを緩めに固定します。キャピラリーの終端の位置がスプレーヤー先端と一直線になるようにします。指の爪を使うこともできます。
3. 最後に、キャピラリーが定位置に保てるようにフィッティングネジをきつく締めます。スプレーヤーにおけるキャピラリーの相対的な位置が取り付け作業から分析開始まで動かないように必要があります。そうしないとずれが生じ、パフォーマンスの低下につながります。スプレーヤーを扱うときはスプレーヤー先端に触れないようにしてください。ESI ニードルは破損しやすいので、保護用のスリーブ等を用い、先端を保護してください。ESI ニードルが損傷した場合は交換してください。

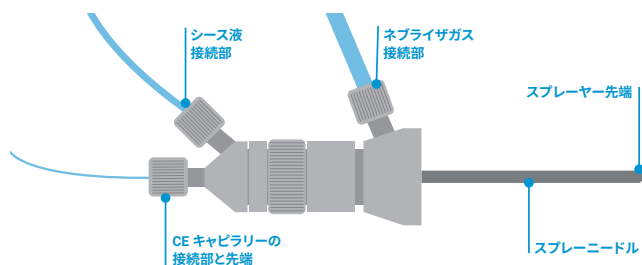


図 36. Agilent CE/ESI-MS スプレーヤー

- 調整ネジを反時計回りに 4 分の 1 回転させます (+ 方向に 2 目盛り)。最後に、キャピラリーがスプレーヤー先端から約 0.1 ~ 0.2 mm 突き出ているかを確認します。
- 顕微鏡を用いて、突き出ているキャピラリーの長さを注意深く確認します。図 40 に示すように、突き出ているキャピラリーの長さはキャピラリーの外径の 3 分の 1 でなければなりません。キャピラリーの外径は 0.365 mm です。  
+ 方向に 2 目盛りの通常の調整をしても、シース液の粘度が異なるなど、スプレー条件によって最適な位置が異なる可能性があります。例えば、通常ではないベースラインまたはスパッタリング現象がみられた場合、+ 方向に 4 目盛りで調整してみてください。

## 16.3

### CE/ESI-MS スプレーヤーの挿入

- ネブライザガスとシース液を CE-ESI スプレーヤーの下側に接続します。
- イオンソースのカバーを取り外します。CE スプレーヤーを MSD のエレクトロスプレーチャンバに慎重に挿入します。スプレーヤー先端は壊れやすいので、スプレーヤー先端とエレクトロスプレーチャンバを接触させないでください。スプレーヤーの位置がずれる可能性があるため、イオンソースへの挿入中に調整ネジの位置でスプレーヤーを持たないでください。
- Agilent CE/MS スプレーヤーキットに同梱のイオンソースカバーをはめ込みます。

## 16.4

### CE キャピラリーの コンディショニング

新しい未修飾フューズドシリカ分離キャピラリーは初回使用前に、適切にコンディショニングする必要があります。1 N NaOH で 5 分間、水で 10 分間、バッファで 20 分間、順次フラッシュする手順がテストサンプルの分析に最適です。コンディショニングを省略すると、全体のパフォーマンスが低下し、特に泳動時間の安定性に影響を及ぼします。コンディショニングは手動で行うこともできます。または、すべての手順をメソッドにプログラムでき、シーケンスに含めることもできます。不揮発性の溶液を使用して洗浄する場合、MS に接続しないで行うか、MS のネブライザ圧、キャピラリー電圧、フラグメンタ電圧が印加されない状態で行ってください。

表 4 にバイアルテーブルの一例を示します。バイアルテーブルの値は、「Instrument (機器)」> 「System (システム)」のバイアルテーブルで入力できます。CE 装置のトレイの次の位置にバイアルをロードします。

表 4. キャピラリーコンディショニングとチェックアウトのバイアル位置

位置	内容
1	1 N NaOH
2	水
3	バッファ (10 mM 酢酸アンモニウム、pH 6.9、0.04 % メタノール)
4	フラッシュ用バッファ (バッファと同じ)
5	テストサンプル (1 mg/mL 硫酸キニーネ無水物)



図 37. CE/ESI-MS スプレーヤー調整ネジ



図 38. CE/ESI-MS スプレーヤーキャピラリー挿入

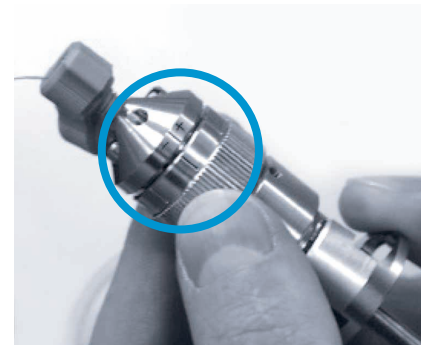


図 39. CE/ESI-MS スプレーヤーキャピラリー調整

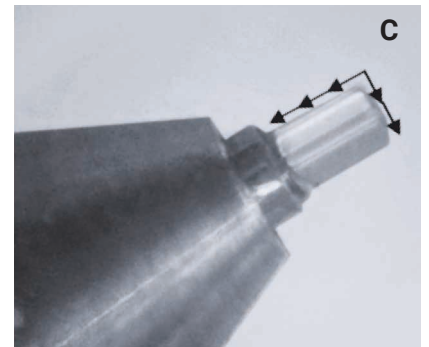
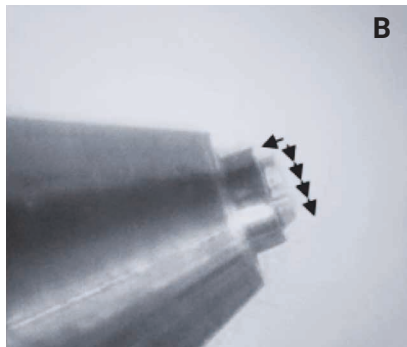
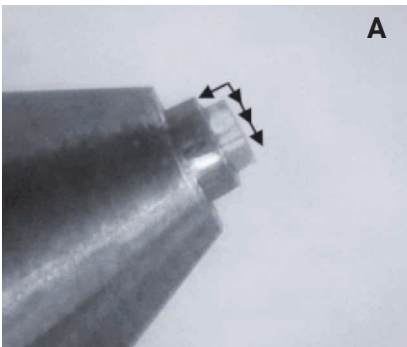


図 40. ESI ニードルから突き出ているキャピラリー、良い例 (A、B)、悪い例 (C)



図 41. ネブライザガスに接続



図 42. CE/ESI-MS スプレーヤーをMS イオンソースに挿入



図 43. 取り付けが完了した CE/ESI-MS スプレーヤー

スプレーヤーアセンブリをイオンソースから取り外し、廃液を回収するためにピーカーの上に置いている間にコンディショニングを行うことができます。これはより厳しい条件（濃塩酸、 $> 1 \text{ M}$  ギ酸または  $> 1 \text{ M NaOH}$ ）でのプレコンディショニング手順での使用を特に推奨します。キャピラリーは仕様書に従ってコンディショニングします。内面コーティングされたキャピラリーは、このような強い洗浄によりコーティングが劣化して使用できなくなるのでご注意ください。

キャピラリーまたは電極の外側に付着する可能性のあるコンディショニング溶液（NaOH など）によるバッファバイアルの汚染を最小限にするには、バッファの入った実際の注入口および出口バイアルを機器にロードする前に、バッファの入った専用の大きなバイアルにインレット電極を付けることを推奨します。これは、「load vial (ロードバイアル)」と「wait (待機)」のコマンドの組み合わせにより、事前にタイムテーブルにプログラムすることができます。

## 16.5 CE 電流の確認

前述のスプレーヤーアセンブリの取り付けと分離キャピラリーのコンディショニング後、電気泳動条件下で CE 電流が一定になると予測されます。そのため、サンプルの分析を始める前に、キャピラリーの調整とシース液の流れに問題がないかを簡単に確認するとよいでしょう。安定な CE 電流は適切な取り付けができていようかの目安となります。ESI 条件下での導電性の確認の対象は電気泳動部であり、MS 部ではありません。これを確認するテストは CE/MS システムダイアグラムから簡単に実行できます。

このテストの間、ESI 電圧をオフにします。

アイソクラティックポンプで流量  $0.4 \text{ mL/min}$  に設定します。

1. バッファの入ったバイアルをインレットリフトにロードします。
2. 5 分間キャピラリーにバッファを流します。
3. 10 分間  $15 \text{ kV}$  にします。
4. ChemStation のオンラインプロットで電流をモニタリングします。

CE 装置の自動ランプは  $6 \text{ kV/s}$  で、3 秒後に  $15 \text{ kV}$  になります。電流も短時間で安定します。絶対的な電流値は実際のキャピラリーの長さによって変わります。酢酸アンモニウムバッファ条件で  $80 \sim 125 \text{ cm}$ 、内径  $50 \mu\text{m}$  のフューズドシリカキャピラリーの場合、 $1 \sim 2 \mu\text{A}$  の範囲です。チェックアウト中の電流シグナルを図 44 に示します。

スプレーヤー本体、ポンプ、デガッサ、チューブの内側の物質は時間とともに洗い流され、完全に洗い流されるまで長期にわたり CE/MS 実験に影響を及ぼすことがあります。また、スプレーヤーの内側のシース液に触れるキャピラリーの外側も、同じく長期間にわたって洗い流される可能性があります。平衡化の時間が長くなるのは、シース液の流量が低いからです。

機器のメソッド def\_CE.M をオンラインの ChemStation にロードし、表 5 に示したメソッドパラメータをプログラムしてください。機器のモードは電流の下限アラームがない CE/MS にする必要があります。

テストサンプルのバイアルから 5 回連続注入のシーケンスを設定し、実行します。システムの平衡化のため、シーケンスの最初の分析はうまくいかない可能性があり、無視する必要があります。次の分析は図 45 に示したように UV および MS トレースが見られます。

MS トレースのピークから得られた MS スペクトルは図 46 に示したようになります。CE 電流は (キャピラリーの長さと実際のバッファ濃度によりますが) 約 4 ~ 7  $\mu\text{A}$  になります。

表 5. テストサンプルの CE/MS 分析条件

<b>CE</b>	キャピラリー	フューズドシリカキャピラリー (内径 50 $\mu\text{m}$ 、全長 80 ~ 125 cm、UV 検出ウィンドウ、NaOH でコンディショニング)	<b>MS</b>	MSD の使用	有効化
	バッファ	10 mM 酢酸アンモニウム、pH 6.9、0.04 % メタノール		ストップタイム	制限なし
	電圧	0 kV		イオンソース	AP ESI
	温度	20 °C		スキャン範囲	m/z = 100 ~ 500
	バッファ交換	なし		タイムフィルタ	有効化
	プレコンディショニング	バイアル 4 からバッファで 5 分間洗浄		データ保存	圧縮
	サンプル	アジレントのチェックアウトサンプル (キニーネ硫酸塩)		ピーク幅	0.12 分
	注入	圧力 50 mbar、2.0 秒間、バイアル 5、テストサンプル		シグナル 1	
		圧力 50 mbar、2.0 秒間、バイアル 3、バッファ		モード	スキャン
	タイムプログラミング	0.3 分、電圧 +27 kV		範囲	m/z = 100 ~ 500
ストップタイム	10 分	極性	ポジティブ		
<b>DAD</b>	信号	254.16 nm	フラグメンタ電圧	65 V	
	基準	450.80 nm	スレッシュホールド	50	
	スペクトル	毎秒 190 ~ 450 nm	ステップサイズ	0.01	
	オートバランス	ブレラン	シグナル 2		
	ストップタイム	CE と同じ	モード	SIM	
	取り込み時に電源 ON が必要なランプ	UV ランプ	極性	ポジティブ	
			サイクル時間	50 % サイクル時間	
<b>ポンプ</b>	流量	0.4 mL/min	SIM イオン	325	
	ストップタイム	制限なし	フラグメンタ電圧	65 V	
	溶媒 A	100 %、5 mM 酢酸アンモニウム、pH 6.9、50 % MeOH	スプレーチャンバ		
	圧力	0 ~ 400 bar	ガス温度	130 °C (最大 350 °C)	
			ドライガス	10.0 L/min (最大 13.0)	
			ネプライザ圧力	10 psi (最大 60)	
		$V_{\text{cap}}$	4000 V		

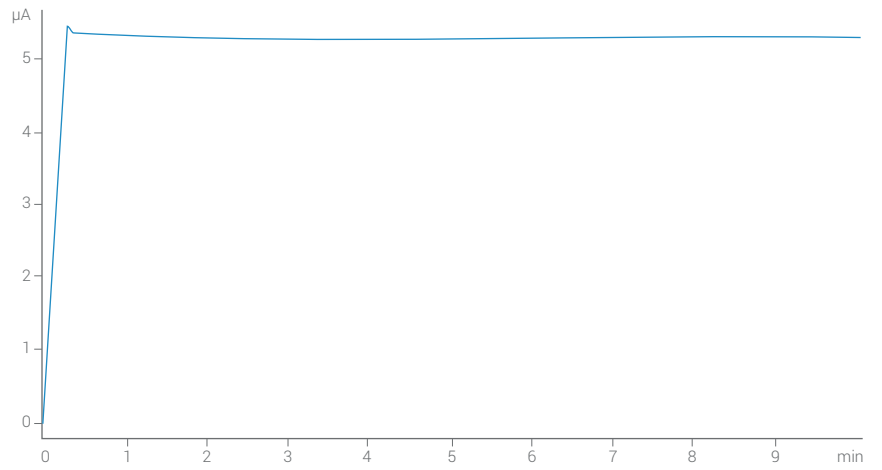


図 44. 27 kV でチェックアウト中の電流の安定性

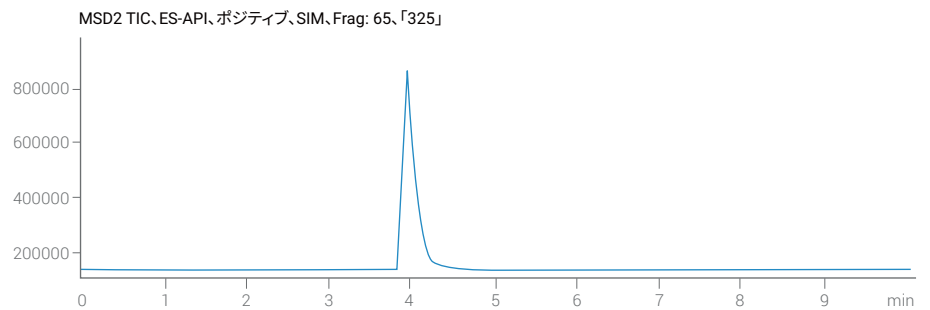
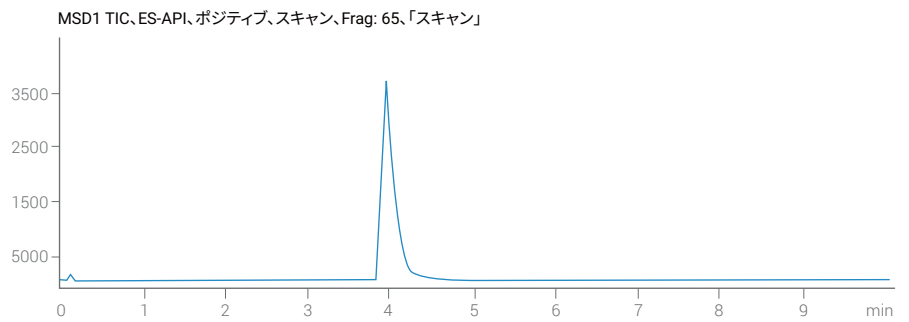
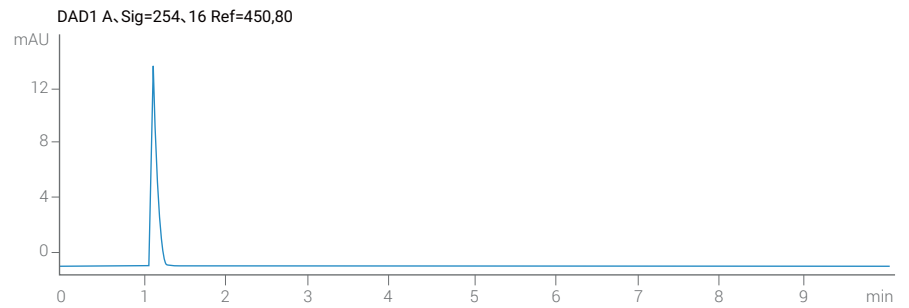


図 45. UV、スキャンおよび MS の SIM トレース

## 16.7

### 使用後の CE/MS キャピラリー、 シースフロープリッタ、および CE/MSD スプレーニードルの保管

キャピラリー、シースフロープリッタ、および CE/MSD スプレーニードルを使用しないときは、詰まりを防ぐためにクリーニングします。シースフロープリッタと CE/MSD スプレーニードルのクリーニングは次の手順で行います。

1. シース液のボトルを水の入ったボトルに交換します。
2. CE/MS キャピラリー、シースフロープリッタ、ネブライザガスは接続したままにします。
3. ポンプを用意して 10 分間フラッシュし、シースフロープリッタと CE/MSD スプレーニードルにポンプで水を流します。
4. シース液ボトルの水をイソプロパノールに交換します。
5. ポンプを用意して 10 分間フラッシュし、シースフロープリッタと CE/MSD スプレーニードルにポンプでイソプロパノールを流します。

CE/MS キャピラリーは次のように保管します。

1. キャピラリーに水を 10 分間流します。
2. 空のキャップ付きバイアルをトレイに挿入し、空気でキャピラリーを 10 分間フラッシュします。
3. キャピラリーを取り外し、保管します。

シース液が流れていないと、MS ドライガスによってスプレーニードルの熱損傷が発生する可能性があります。シース液がなく、ドライガスが高温の状態では機器を放置しないでください。この場合は、ESI スプレーヤーをイオンソースから取り外してください。使用後は、ネブライザ調整台（部品番号 GT430-20470）に載せた状態でスプレーヤーを保管してください。

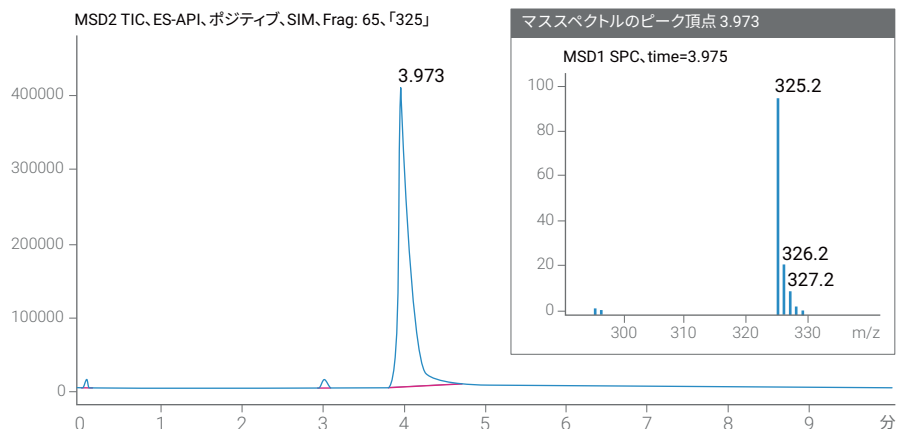


図 46. MS スキャンレースからの MS スペクトル

# 17 DAD を用いた CE/MS 分析メソッドの設定

## 17.1 CE/MS メソッドの設定

本項で示すパラメータは、分析したテストサンプル（硫酸キニーネ）に典型的なものです。しかし、他のサンプルを分析する際にこのパラメータを適用することもできます。

CE モードで実行するアプリケーションのメソッドパラメータの一般的な手順は 7100 CE システムのユーザーマニュアルの「How to Use Your Agilent CE Instrument for Capillary Electrophoresis Separations」の項（部品番号 G7100-90000）をご覧ください。パラメータは CE/MS モードでのメソッド設定とも一致します（図 47）。

「Setup Instrument Method（機器のメソッド設定）」画面で、最新の RC.net ドライバを使用したシステム部にアクセスすることができます。一方、Classicドライバで制御するシステム部は、この画面には表示されません。Agilent InfinityLab LC/MSD シリーズシステムにはClassicドライバが使用されています。そのため、メソッドの MS 部については別途プログラムする必要があります。セクション 17.2 「CE/MS メソッドの MS 部の設定」をご覧ください。

ポンプを含む CE/MS システムの場合は、ポンプのパラメータのタブが表示されます（図 48）。変更できるパラメータの詳細については、アイソクラティックポンプのマニュアルをご覧ください。CE/MS アプリケーションに主に関わるパラメータは流量です。スプレーヤーに用いられる実際の流量は、1:100 スプリッタ（設定値）により減少します。

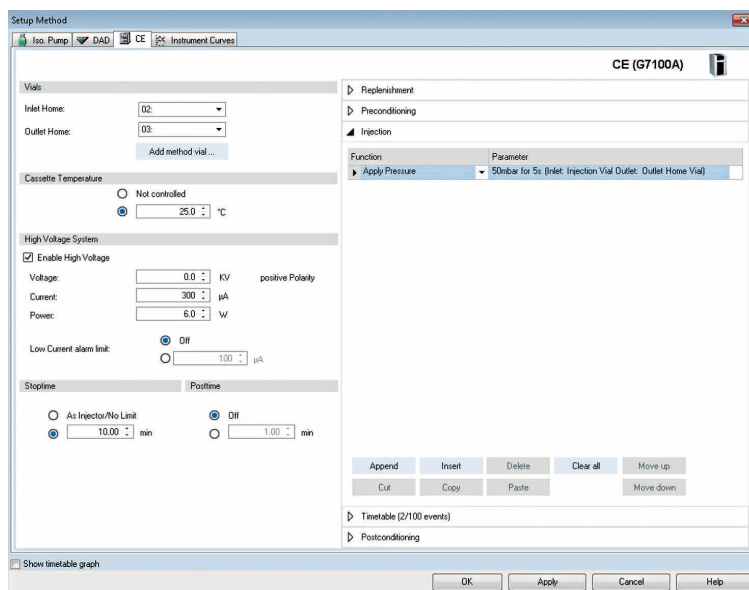


図 47. CE/MS メソッドの設定 (CE パラメータ)

「Setup Instrument Method (機器のメソッド設定)」画面の別のタブでは、CE、DAD、ポンプのパラメータの記録ができる「Instrument Curves (機器カーブ)」にアクセスできます (図 49)。

CE/MS モードでは、リーク電流はトラブルシューティングに使用できません。オンラインプロットからも、機器カーブに記録することもできません。CE、CE+p、または CEC モードでの電気泳動と対照的です。なぜならキャピラリーの端に異なる装置、すなわち MS イオンソースが付き、電流は HV 電源に戻らずアースに流れるためです。そのためデータは記録されません。

出口バイアルがない状態でのインレット電極の洗浄は、分離キャピラリーへ空気が流れ込む原因となる可能性があります。後で必ずフラッシュしてください。そうしないと導電性がなくなり、アーク放電が生じる可能性があります。

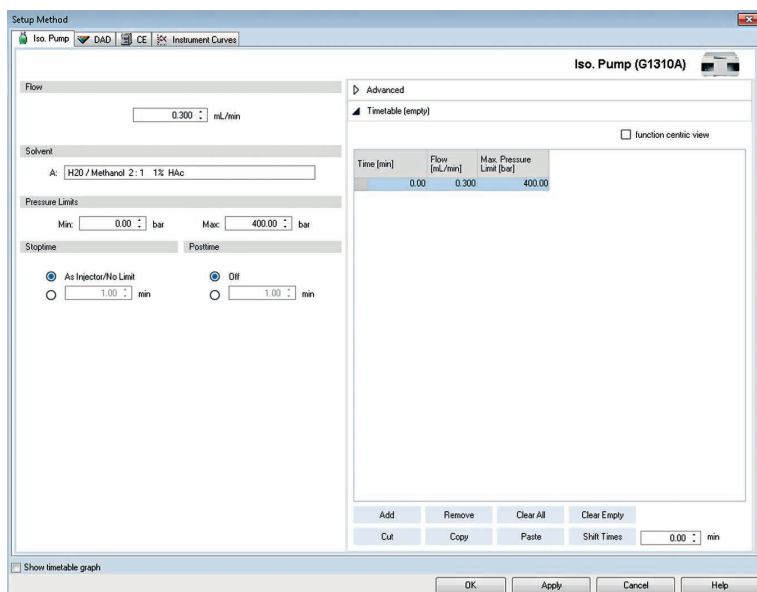


図 48. CE/MS メソッドの設定 (ポンプパラメータ)

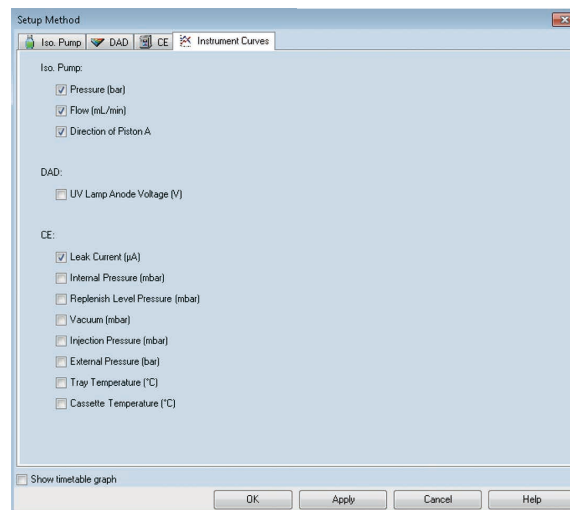


図 49. CE/MS メソッドの設定 (機器カーブの選択)

Agilent InfinityLab LC/MSD シリーズシステムはClassic ChemStation ドライバで制御されます。RC.net ドライバで制御される CE 装置、DAD、ポンプとは異なる画面でプログラムする必要があります。「Instrument (機器)」>「More MSD (MSD の詳細)」、またはシステム制御ダイアグラムのアイコンをクリックすると、該当画面にアクセスできます。

表 6. 従来のスプレーチャンバパラメータの設定の一般的な設定値

パラメータ	設定値
ドライガス	6~10 L/min
ドライガス温度	100~300 °C
ネブライザガス	10~20 psi
HV (ポジティブモード)	3.5~4 kV
HV (ネガティブモード)	3~3.5 kV

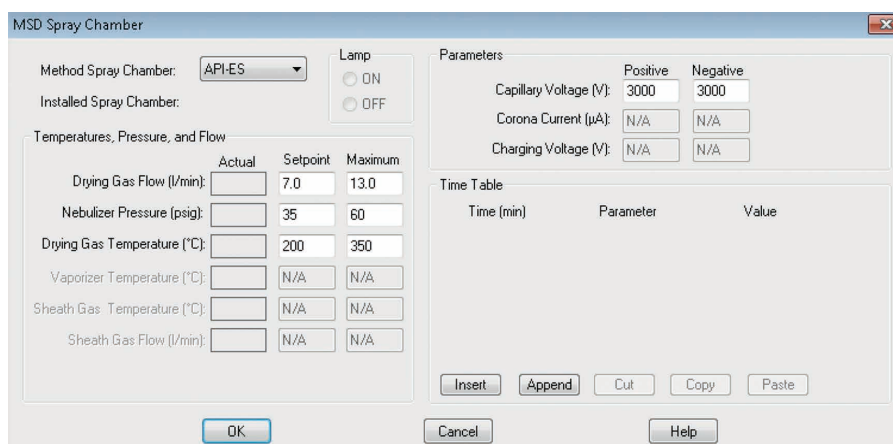


図 50. MS メソッドの設定 (スプレーチャンバ)

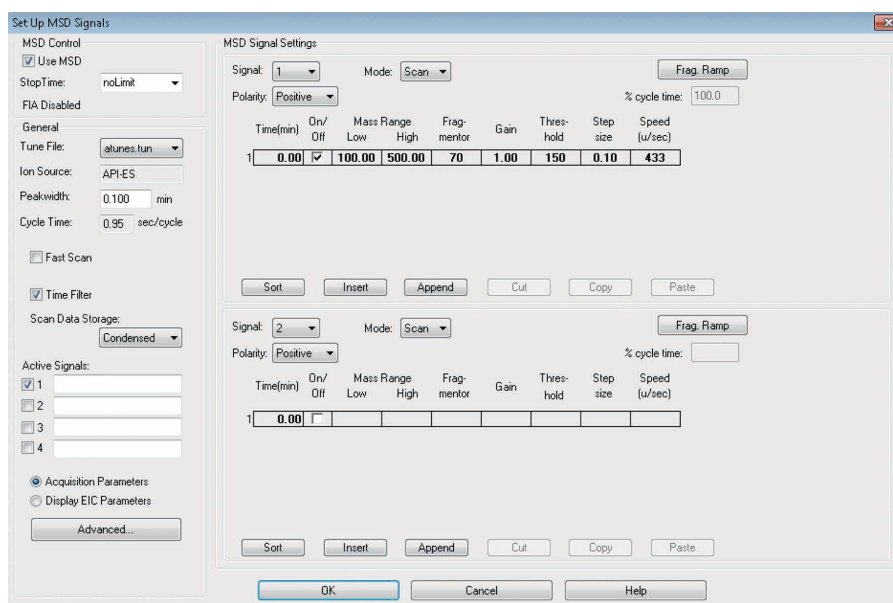


図 51. メソッドパラメータ (MSD シグナル)

### 17.3

#### DAD を使用しない CE/MS 分析メソッドの設定

UV ランプを点灯せず、DAD シグナルの記録なしで分析を実行する場合は、メソッドの DAD 部のパラメータを次のように設定します。この設定により、通常の機器のカセット検出アルゴリズム (UV ランプ点灯、アライメントインタフェース必要) が不要になります。UV 検出ウィンドウのないキャピラリーをセクション 14.2 の図 29A で示した別の方法で挿入する場合は、次の設定を行う必要があります。

1. 「Setup Instrument Method (機器のメソッド設定)」画面から、DAD メソッドパラメータにアクセスします。または、DAD 制御インタフェースをクリックすると、現行メソッドの DAD 部のみアクセスできます。
2. 「Lamps on required for acquisition (取り込み時に電源 ON が必要なランプ)」セクションの「UV lamp (UV ランプ)」のチェックボックスのチェックを外します。
3. 「Autobalance (オートバランス)」セクションの「Prerun (プレラン)」「Postrun (ポストラン)」のチェックボックスのチェックを外します。
4. 「Signals (シグナル)」セクションの「Use Signal (使用シグナル)」のチェックボックスのチェックをすべて外します。
5. OK をクリックして、メソッドを保存します。
6. 必要に応じてメソッドの他のパラメータを個別に変更します。

上記の設定でメソッドをロードしても、UV ランプはオフになりません。このようなメソッドを用いる分析で UV ランプの光がカセットを通過しないようにするには、ランプを手動でオフにします。

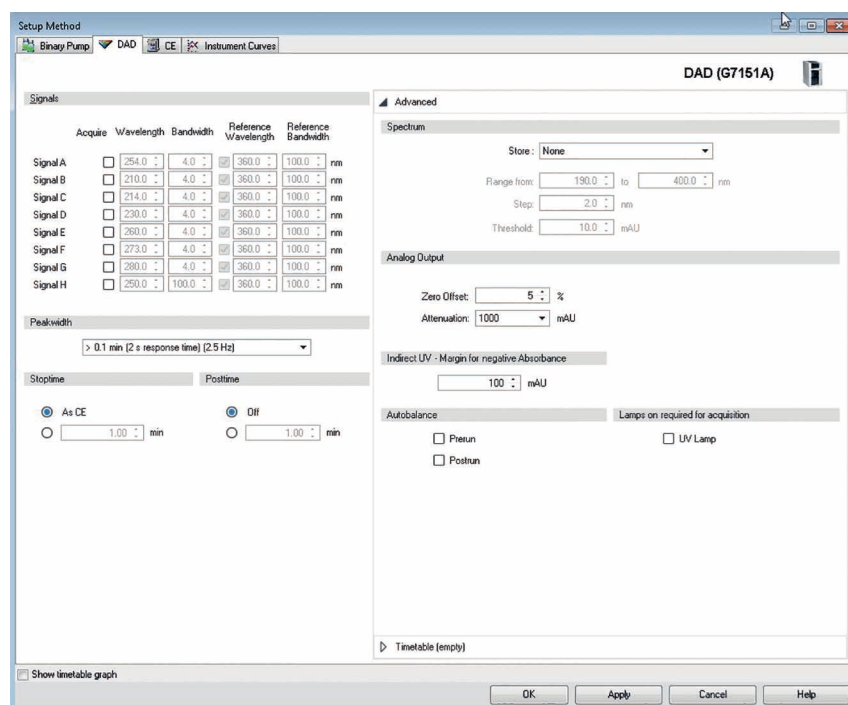


図 52. UV ランプオフの場合の CE/MS 分析のパラメータ

## コントロール図からの DAD の削除

CE/MS システムを DAD 検出なしの分析に使用する場合は、DAD をユーザーインターフェースの構成から外すことにより、コントロール画面から削除することができます。しかし、他の分析モード (CE、CE+p、CEC、CE/MS) に切り替える必要がある場合は、構成には DAD を残すことを推奨します。

CE/MS システム内の Agilent 7100 CE 装置のコンポーネントが、CE コントロール図 (ダッシュボード) に表示されます (図 53)。

DAD、ポンプ、MS など、CE/MS システムの他のコンポーネントはすべて、それぞれ個別の図に表示されます。現在の分析モードが CE コントロール図の一番上の行に表示されます。機器の構成で選択できる分析モードは、CE、CE+p、CEC、CE/MS です。「Instrument (機器)」>「More CE (CE の詳細)」>「Instrument Configuration (機器構成)」を選択して、機器の現在の CE モードを変更できます (図 21 を参照)。

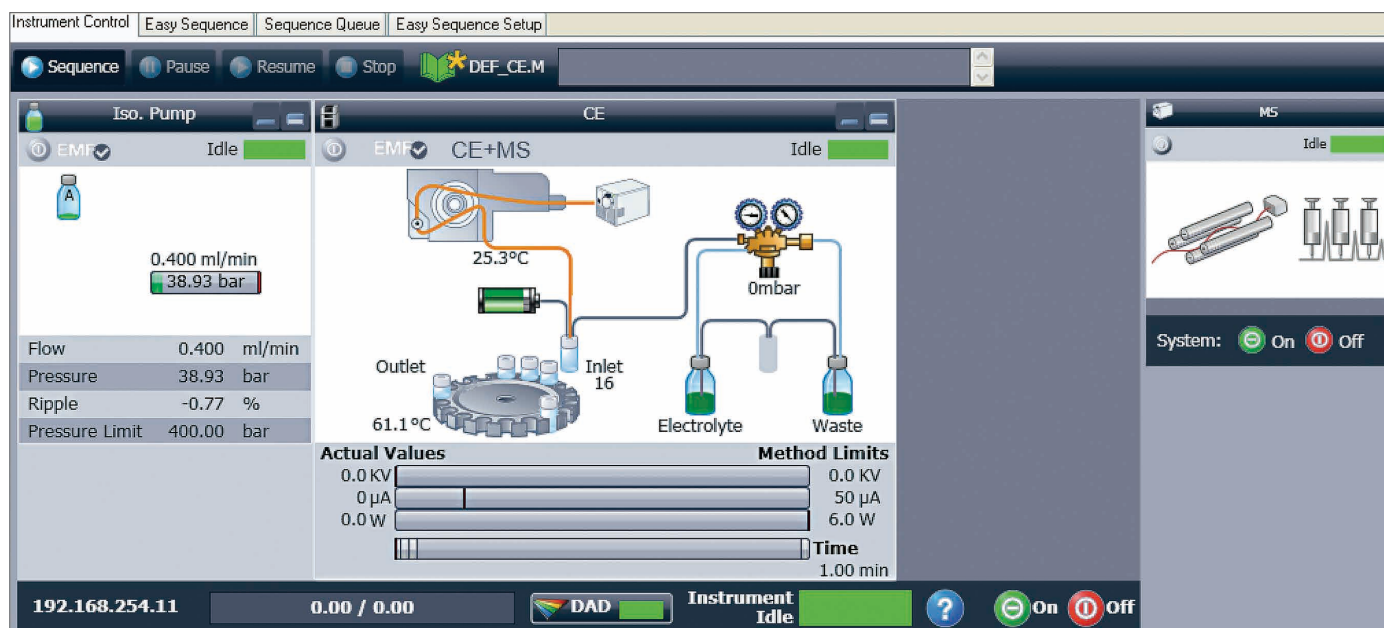


図 53. DAD コントロールインターフェースを最小化したときのシステムダイアグラム

## 17.5

### グラフィカルユーザー インタフェースの説明

Agilent CE/MS システム内の CE 装置のコアコンポーネントが、CE コントロール図 (ダッシュボード) に表示されます。図 20 を参照してください。DAD、ポンプ、MS など、CE/MS システムの他のコンポーネントはすべて、それぞれ個別の図に表示されます。現在の分析モードが CE コントロール図の一番上の行に表示されます。機器の構成で選択できる分析モードは、CE、CE+p、CEC、CE/MS です。「Instrument (機器)」>「More CE (CE の詳細)」>「Instrument Configuration (機器構成)」を選択して、機器の現在の CE モードを変更できます (図 21 を参照)。

DAD ユーザーインタフェースの右上隅にあるアイコンをクリックすると、DAD ユーザーインタフェースを最小化できます。最小化した DAD アイコンは全体のステータスアイコンと同じ列にあります (図 53)。

機器の構成から DAD を完全に取り除く前に、DAD のいくつかのパラメータ (図 52) を次の手順で設定します。これらのパラメータは DAD に適用されます。構成から DAD を外すと、システムダイアグラムからは直接アクセスできなくなり、メソッドで変更されるまで、パラメータは保持されます。

1. 各機器に接続された ChemStation のオンラインコピーで DAD がまだ構成されている間に、次の手順を実行します。
2. CE のデフォルトメソッドをロードします。
3. 「Instrument (機器)」メニューの「Set up Instrument Method (機器メソッドの設定)」アイテムを選択して、メソッドパラメータにアクセスします。すべてのメソッドにアクセスできる「CE Method Setup (CE メソッド設定)」が表示されます。DAD 部の現行メソッドのみにアクセスするには、DAD コントロールインタフェースをクリックするだけでもアクセスできます。
4. 「Lamps on required for acquisition (取り込み時に電源 ON が必要なランプ)」セクションの「UV lamp (UV ランプ)」のチェックボックスのチェックを外します。
5. 「Autobalance (オートバランス)」セクションの「Prerun (プレラン)」「Postrun (ポストラン)」のチェックボックスのチェックを外します。
6. 「Signal (シグナル)」セクションの「Use Signal (使用シグナル)」のチェックボックスのチェックをすべて外します。
7. OK をクリックして設定を適用します。

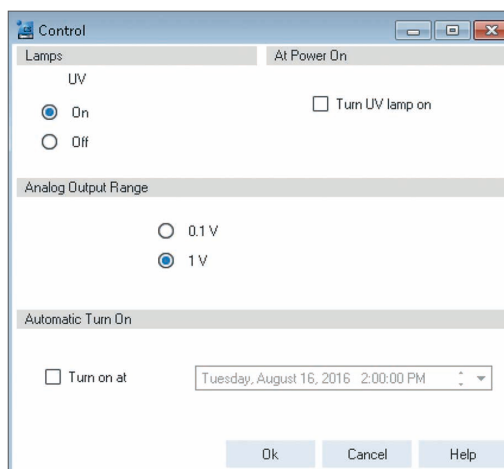


図 54. DAD コントロールのパラメータ

8. CE/MS メソッドフォルダに別の名称でメソッドを保存します。
9. ChemStation の「Method and Run Control (メソッド&コントロール)」で、「Instrument (機器)」>「More DAD (DAD の詳細)」/「Control (コントロール) ...」>「Control (コントロール)」を選択し、DAD コントロール画面 (図 54) を開きます。
10. 「At Power On (電源 ON)」セクションの「Turn UV lamp on (UV ランプ ON)」のチェックボックスのチェックを外します。
11. 「Lamps (ランプ)」セクションの「UV lamp on (UV ランプ On)」のチェックボックスのチェックを外します。
12. 「Automatic Turn On (自動電源 ON)」に何も入力されていないことを確認します。
13. 「OK」をクリックします。
14. UV ランプの電源がオフになっていることを確認します。

DAD で設定したパラメータに関して、Agilent Lab Advisor ソフトウェアと ChemStation ではステータス情報が異なる場合があります。Lab Advisor では、DAD なしで構成した装置は、UV ランプの電源が入っていないため、DAD が「not ready (準備未完了)」となります。システムが ChemStation で分析開始の準備ができていても「not ready (準備未完了)」ステータスを示します (図 55)。

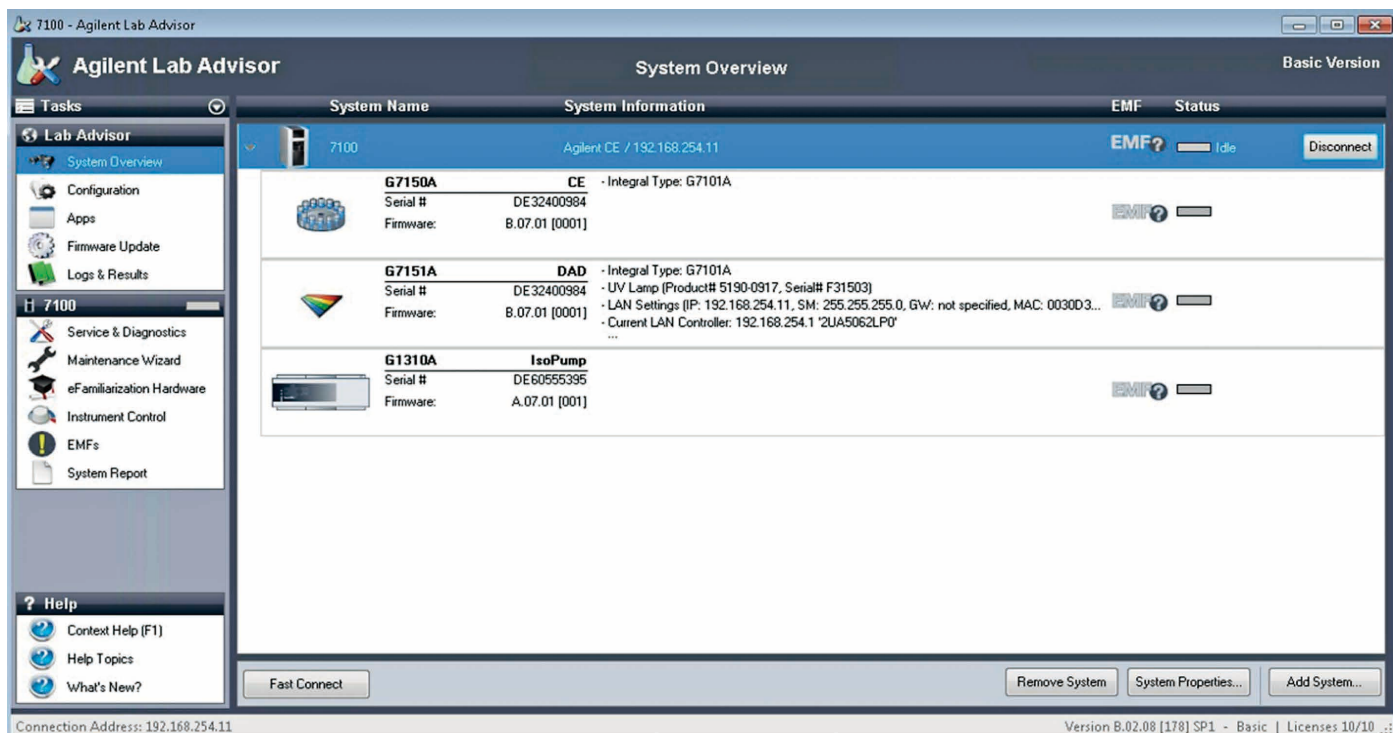


図 55. Agilent Lab Advisor のシステム概要

## 18 CE/MS のメソッドとアプリケーション

以後のセクションでは、陽イオンと陰イオンを分析するための、2種類の高度な CE/MS メソッドについて説明します。ここに示す設定情報は、Agilent InfinityLab LC/MSD シリーズシステムと機器コントロール用の Agilent OpenLab CDS ソフトウェア (ChemStation Edition) に関するものです。飛行時間型、トリプル四重極、四重極飛行時間型シリーズの Agilent LC/MS を使用する場合は、ソースパラメータとデータ取り込みパラメータの設定値例については、アジレントのアプリケーションノートを参照してください。

実際のサンプルを分析する前に、CE/MS 分析を用いて標準物質を分析し、デバイスとスプレーヤーが正常であることを確認します。例として、陽イオン分析条件におけるアミノ酸分析と、陰イオン分析条件におけるリンゴ酸分析を使用します。本書で使用するアミノ酸サンプルと有機酸サンプルのデータは、四重極 MS で収集しました。

### 18.1

#### 陽イオンの CE/MS 分析のメソッド

ここでの分析条件 (表 7) は、ほぼすべての塩基性化合物の測定に使用できる一般的な分析条件です。図 56、図 57、図 58 に、アミノ酸サンプルによる分析結果を示します。

低 pH バッファ (pH 1.9) を使用し、使用するすべてのアミノ酸の等電点が 1.9 より高いため、これらはサンプル内と分離中では陽イオンとして存在します。一般的に、塩基性置換基を持つすべての化合物は、これらの分析条件で測定できます。CE 分離では、正電圧をかけます。

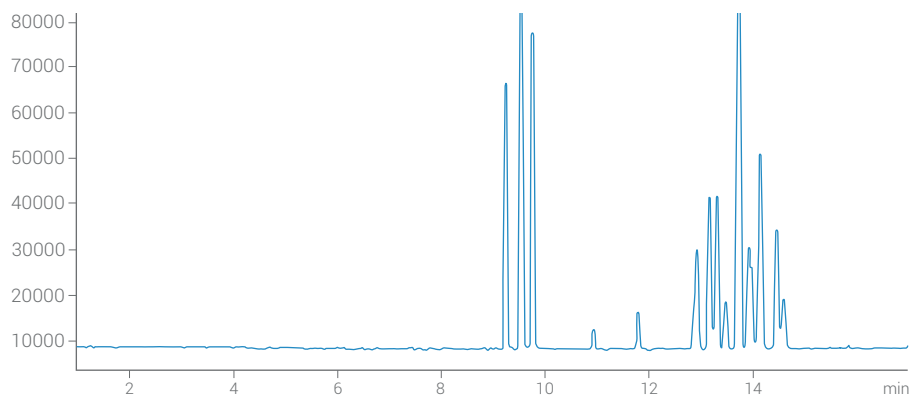


図 56. 100 µM のアミノ酸標準混合物 (部品番号 5061-3330)

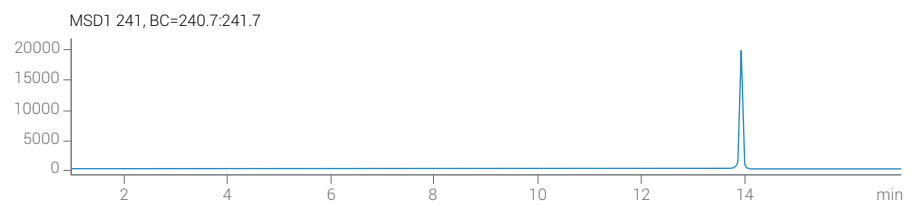
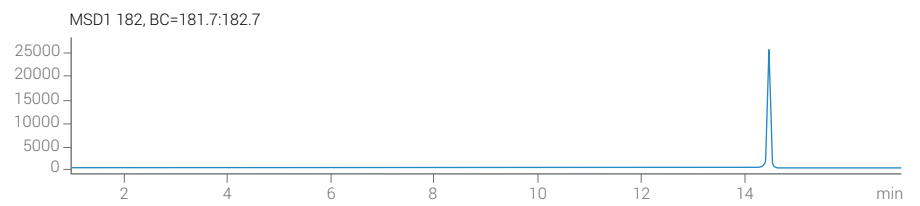
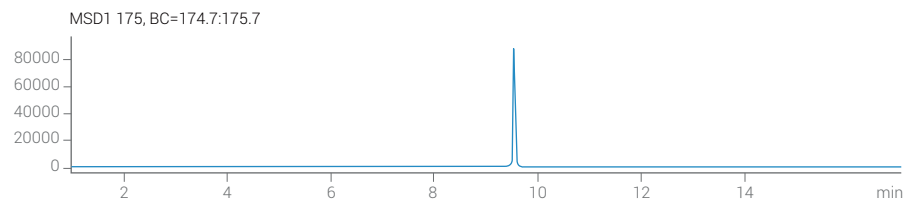
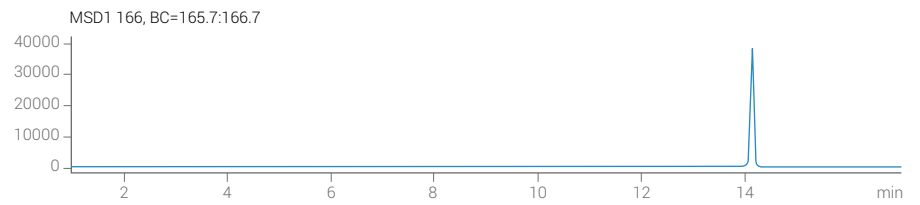
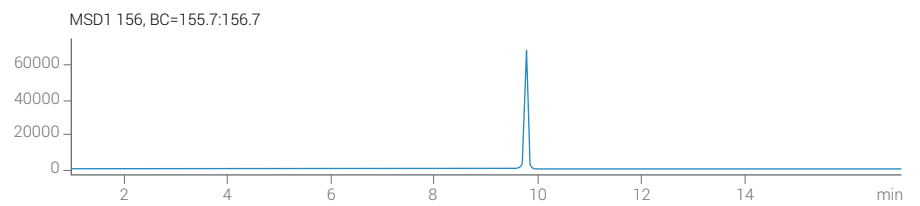
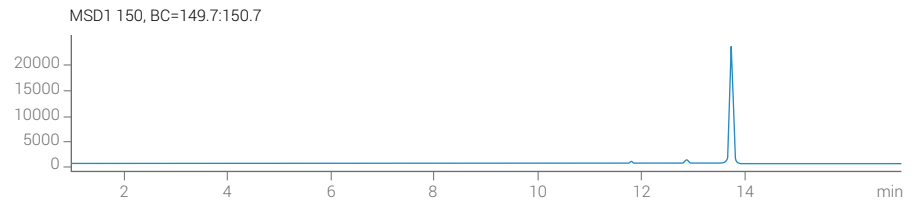
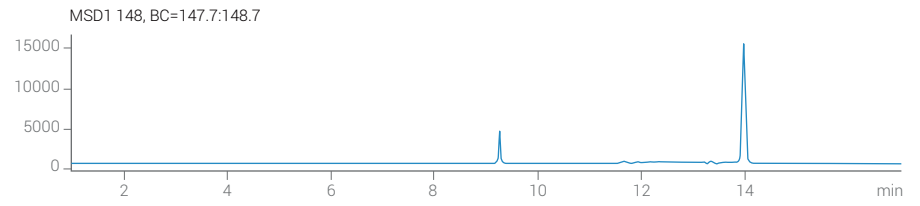


図 57. 各種アミノ酸標準のマスエレクトロフェログラム (SIM)

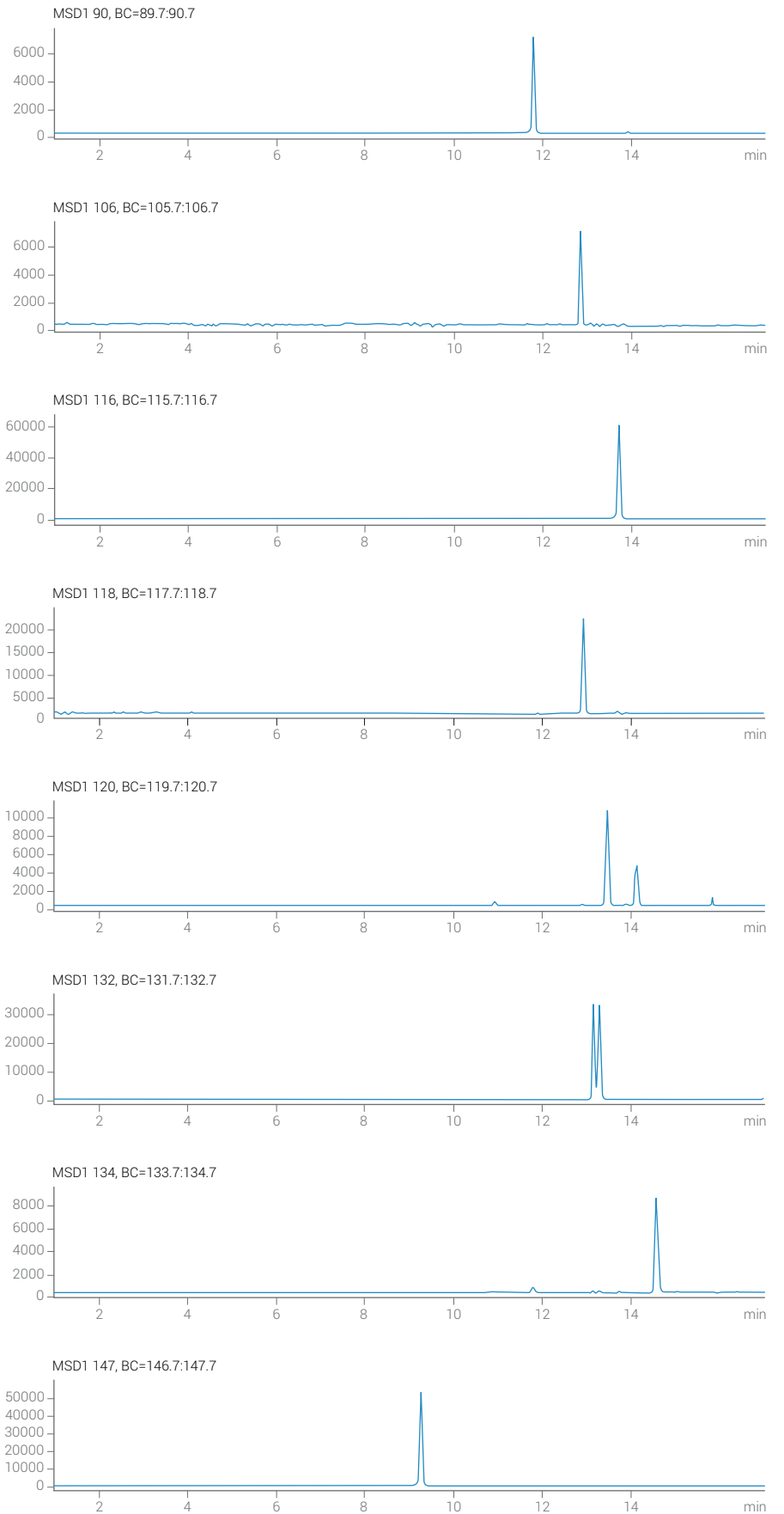


図 58. 各種アミノ酸標準のマスエレクトロフェログラム (SIM)

表 7. CE/MS 分析条件 (陽イオン分析用)

CE キャピラリー	フューズドシリカキャピラリー、内径 50 $\mu\text{m}$ 、全長 100 cm UV 検出ウィンドウなし
バッファ	1 M 酢酸
電圧	ポジティブ、30 kV
温度	20 °C
プレコンディショニング	バッファで 5 分間フラッシュ
注入圧力	50 mbar で 8.0 秒 (サンプル)
圧力	50 mbar で 2.0 秒 (注入口バイアル)
タイムプログラミング	0.3 分
電圧	+30 kV
MS 極性	ESI ポジティブ
キャピラリー電圧	4000 V
フラグメンタ電圧	100 V
ドライガス、温度	N <sub>2</sub> 10 L/min、300 °C
ネブライザガス圧力	10 psi
シース液	5 mM 酢酸アンモニウム (50 % メタノール中)
流量	8 $\mu\text{L}/\text{min}$
サンプル	0.1 nmol/ $\mu\text{l}$ まで希釈したアミノ酸標準混合物 (部品番号 5061-3330)

## 18.2

### 陰イオンの CE/MS 分析のメソッド

#### 陰イオン分析条件: 有機酸

有機酸の分析例を次に示します。これらの化合物の分析には、分析条件 (表 8) を適用できます。具体的には、BGE の pH の陰イオン (脂肪族カルボン酸、芳香族カルボン酸、およびその他の弱酸性物質など) を使用します。

表 8. CE/MS 分析条件 (陰イオン分析用)

CE キャピラリー	フーズドシリカキャピラリー、内径 50 $\mu\text{m}$ 、全長 80 cm (100 cm のキャピラリーを使用可能) UV 検出ウインドウなし
バッファ	20 mM ギ酸アンモニウム、pH 10 (1 % の $\text{NH}_4\text{OH}$ で調整)
電圧	0 ~ +30 kV (グラジエント)
温度	20 °C
プレコンディショニング	バッファで 4 分間フラッシュ
注入	50 mbar の圧力で 8.0 秒 (サンプル)
圧力	50 mbar で 2.0 秒 (注入口バイアル)
タイムプログラミング	0.3 分、電圧 +30 kV
MS 極性	ESI ネガティブ
キャピラリー電圧	350 V
フラグメンタ電圧	100 V
ドライガス、温度	$\text{N}_2$ 10 L/min、300 °C
ネブライザガス圧力	10 psi
シース液	5 mM 水酸化アンモニウム (50 % メタノール中)
流量	8 $\mu\text{L}/\text{min}$
サンプル	有機酸テスト混合物、部品番号 8500-6900、1 mg/L の 乳酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸を含む

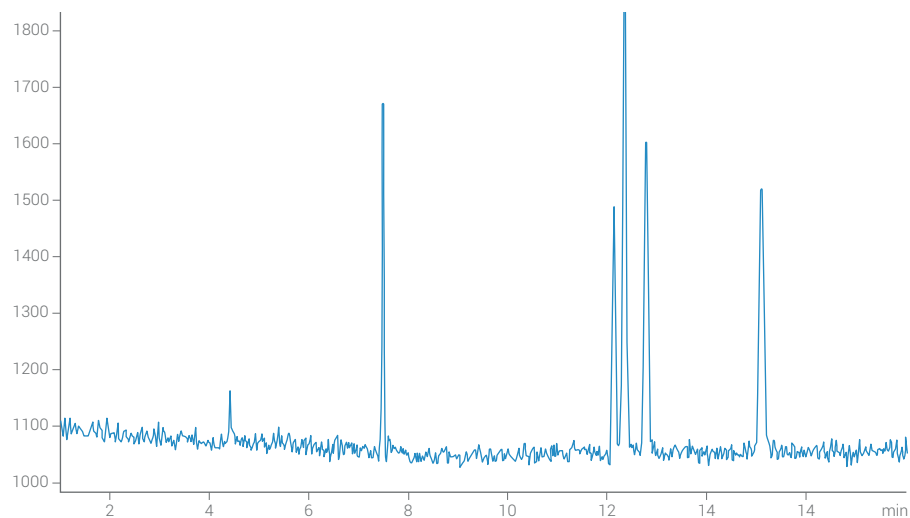


図 59. 1mg/L の乳酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸の CE 分離

### 陰イオン分析条件: p-トルエンシルホン酸

p-トルエンシルホン酸の分析を、基本条件下での陰イオン分析例として示します。条件は表 9 のとおりです。取得したトータルイオンエレクトロフェログラムは図 60 のとおりです。 $m/z = 171$  で抽出したマスエレクトロフェログラム (p-トルエンシルホン酸の擬分子イオン  $[M-H]$ ) を、図 60 に示します。トルエンシルホン酸のマススペクトルを図 61 に示します。参考までに、この分析で使用したキャピラリー電気泳動ユニットの電流値を図 61 に示します。

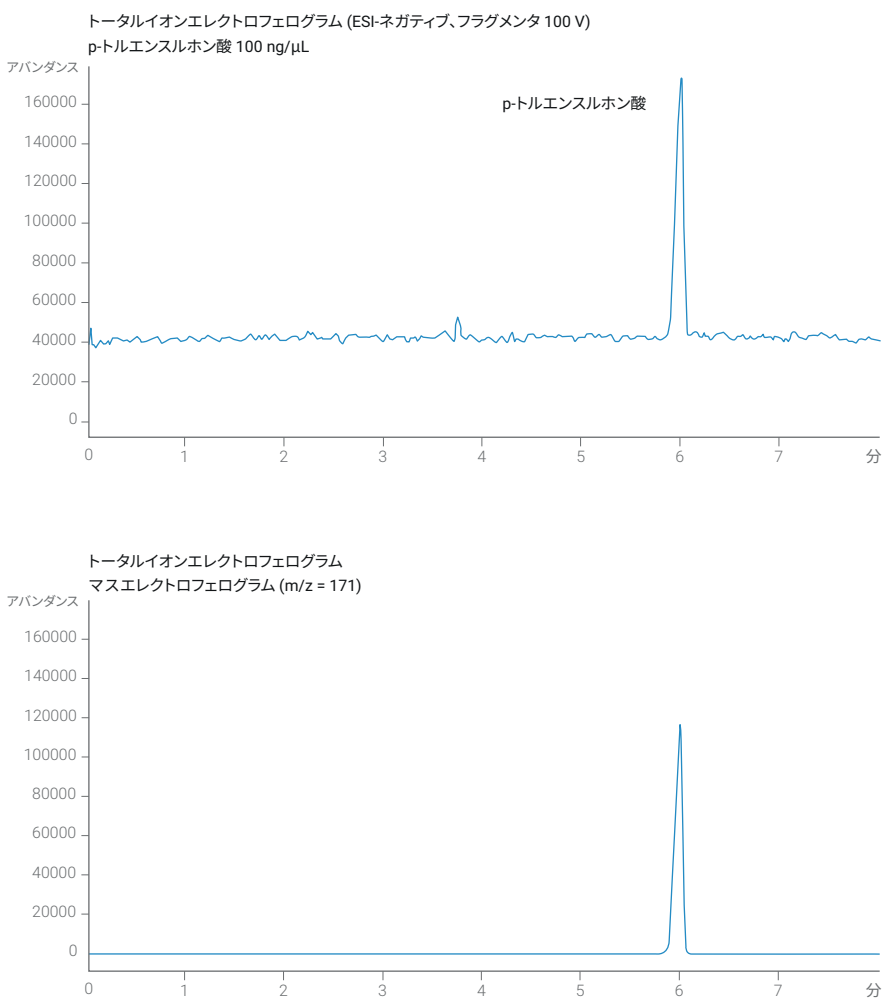


図 60. 上のエレクトロフェログラム: 100 ng/μl の p-トルエンシルホン酸溶液のトータルイオンエレクトロフェログラム。下のエレクトロフェログラム: 抽出したイオンエレクトロフェログラム ( $m/z = 171$ )、トルエンシルホン酸の擬分子イオンを示す

表 9. CE/MS 分析条件 (p-トルエンスルホン酸用)

CE キャピラリー	フューズドシリカキャピラリー (内径 50 $\mu\text{m}$ 、全長 60 cm) UV 検出ウインドウなし
バッファ	20 mM 酢酸アンモニウム、pH 9.0 (1% の $\text{NH}_4\text{OH}$ で調整)
電圧	ポジティブ、20 kV
温度	25 °C
プレコンディショニング	バッファで 4 分間フラッシュ
注入	50 mbar の圧力で 6.0 秒 (サンプル)
圧力	50 mbar で 2.0 秒 (注入口バイアル)
タイムプログラミング	0.3 分、電圧 +20 kV
MS 極性	ESI-ネガティブ
スキャン範囲	$m/z = 70 \sim 300$
キャピラリー電圧	3500 V
フラグメンタ電圧	100 V
ドライガス、温度	$\text{N}_2$ 10 L/min、300 °C
ネブライザガス圧力	10 psi
シース液	5 mM 酢酸アンモニウム (50% メタノール中)
流量	10 $\mu\text{L}/\text{min}$
サンプル	p-トルエンスルホン酸水和物標準の CAS 番号: 6192-52-5

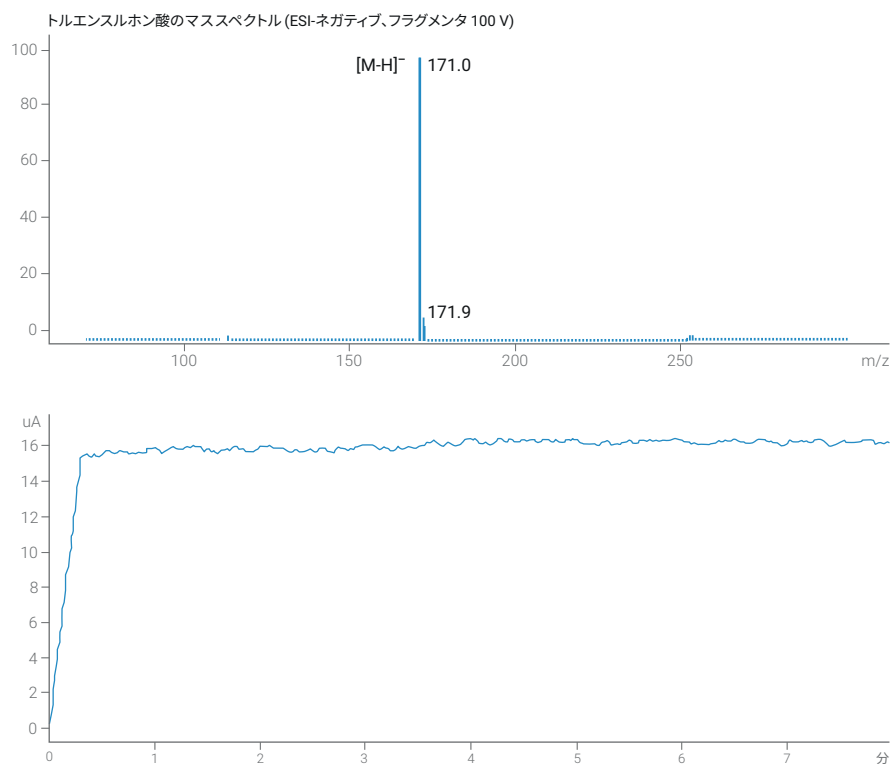


図 61. 上のエレクトロフェログラム: トルエンスルホン酸のマススペクトル。下のトレース: トルエンスルホン酸の分析中の電流値

## 19 メンテナンス

キャピラリー電気泳動は、(ナノリットルではなく) 真のマイクロリットルスケールの分離メソッドです。1000 x 0.05 mm の分離キャピラリーの容量は、約 2  $\mu$ L です。通常のサンプル量は約 2 ~ 10 nL で、浸透流の範囲は 100 ~ 300 nL/min です。

このような条件では、BGE とシース溶媒調製において、高純度な試薬、清浄な水や溶媒の準備が必須です。サンプルマイクロバイアルとサンプル前処理で使用するすべての器具を清潔かつ不活性にしておくだけでなく、ラボ環境も清浄でダストフリーな状態を維持することを推奨します。ラボの温度管理も重要です。CE の出口と CE スプレーヤーの間をつなぐ分離キャピラリーが、ラボ環境の影響を受けるためです。

また、質量分析計が高感度検出器であることにも注意する必要があります。システムの分離部分の部品に汚染物質が入ると、質量分析計によって検知され、誤った同定や解釈によって正しくない答えが出る場合があります。

したがって、ここでは Agilent CE/MS システムを最適な状態に維持するための詳細なガイドラインについて説明します。詳細については、[CE/MS スプレーヤーキットの設置ガイド](#)も参照してください。7100 のメンテナンス情報については、[7100 CE システムのユーザーマニュアル \(部品番号 G7100-90000\)](#) の第 8 章「メンテナンス」と Agilent LC/MS システムの各マニュアルに記載されています。

このトラブルシューティングのセクションは、アジレント製の CE および MS に接続されているシステムにのみ適用されます。

### 19.1

CE/MS キャピラリー、シースフロー  
スプリッタ、および CE/MS スプレー  
ニードルの保管

#### 日常のお手入れ

CE システムや MS システムがアイドル状態の (次回の分析まで待機している) 場合は、シース溶媒フロー、ネプライザガス、ドライガスを流しておきます。その日の測定が終了したり、以後しばらく使用しなかったりする場合は、次の推奨事項に従います。キャピラリー、シースフロースプリッタ、および CE/MSD スプレーニードルを使用しないときは、詰まりを防ぐためにクリーニングします。

#### シースフロースプリッタと CE/MS スプレーニードルのクリーニング

1. シース液のボトルを水の入ったボトルに交換します。
2. CE/MS キャピラリー、シースフロースプリッタ、ネプライザガスは接続したままにします。
3. ポンプを用意して 10 分間フラッシュし、シースフロースプリッタと CE/MS スプレーニードルに、ポンプで水を流します (0.4 mL/min)。

4. シース液のボトルをイソプロパノールの入ったボトルに交換します。
5. ポンプを用意して 10 分間フラッシュし、シースフロープリッタと CE/MS スプレーニードルにポンプでイソプロパノールを流します。

### CE/MS キャピラリーのクリーニングと保管

1. キャピラリーを水で 10 分間フラッシュした後、メタノールでフラッシュします。
2. 空のキャップ付きバイアルをサンプルトレイに挿入し、空のバイアルに圧力をかけて、空気でキャピラリーを 10 分間フラッシュします。
3. キャピラリーを取り外して安全な場所に保管します。キャピラリーの末端はセプタムなどでふさぎます。

### スプレーヤーアセンブリの検査と保管

1. 分離キャピラリーを取り外したら、金属製のスプレーニードルが腐食しているかどうかをチェックし、不溶物を除去します。可能な場合は拡大鏡や顕微鏡を使用し確認します。
2. ニードルが腐食したり、対称または平らでなくなったりしたら、交換が必要です。
3. ニードルやガスケット（部品番号 G1607-20030）の交換については、[セクション 22.1 「CE/MS スプレーヤーキットの組み立て」](#)や [CE/MS スプレーヤーキットの設置ガイド](#)を参照してください。
4. ネブライザ調整台 (GT430-20470) に置き、スプレーヤーとシース溶媒およびネブライザガスを接続した状態にしておきます。

スプレーニードルのメンテナンスの詳細については、『[Nebulizer Adjustment Fixture User Guide \(ネブライザ調整台のユーザーガイド\)](#) (部品番号 G1960-90470)』で LC/MS スプレーヤーに関する説明を参照してください。関連する操作の詳細は、CE/MS スプレーヤーにも適用できます。

シース液が流れていないと、高温のドライガス (200 ~ 300 °C) によってスプレーニードルが破損する可能性があります。シース液がなく、ドライガスが高温の状態では機器を放置しないでください。この場合は、ESI スプレーヤーをイオンソースから取り外してください。

ギ酸などの酸がスプレーヤーに付着したままだと、スプレーニードルが腐食する原因になります。ニードルが汚れていると感度の低下、電流値の異常、キャピラリーの破損などの問題の原因となるため、クリーニングは重要です。

## 20 トラブルシューティング

### 20.1

#### CE 電流に関連する症状

#### 分析中に CE 電流が不安定になり、急上昇したり大幅に低下したりする

原因	解決方法
スプレーヤー先端の電氣的接続に問題があります。	CE/ESI-MS スプレーヤーの CE キャピラリーの軸位置を調整します (セクション 16.2 「CE/ESI-MS スプレーヤーへの CE キャピラリーの挿入と調整」 および図 62 を参照)。
(電解によって) スプレーニードルで気泡が形成されています。	セクション 9.4 「電場と極性」を参照してください。シース溶媒流量を増やして電解ガスを押し出します。 逆極性モードで動作させると、スプレーニードルで陽極酸化による腐食が生じます。標準ニードルをプラチナスプレーヤーニードル (部品番号 G7100-60041) に交換して、ステンレスニードルの腐食の問題を回避します。
シース溶媒の脱気が不十分であるか、シース溶媒の流量が (モーター付きシンジポンプなどにより) 変動しています。	推奨されているアイソクラティックポンプとオンラインデガッサを使用します。
CE キャピラリーに問題があります。キャピラリー内に小さい気泡や粒子があります。DAD を使用している場合は、キャピラリーがアライメントインタフェースで破損する可能性があります。	キャピラリーを強くフラッシュして、電流テストを実施します (セクション 16.5 「CE 電流の確認」を参照)。高倍率の拡大鏡または顕微鏡で、アライメントインタフェース内のキャピラリーを点検します。

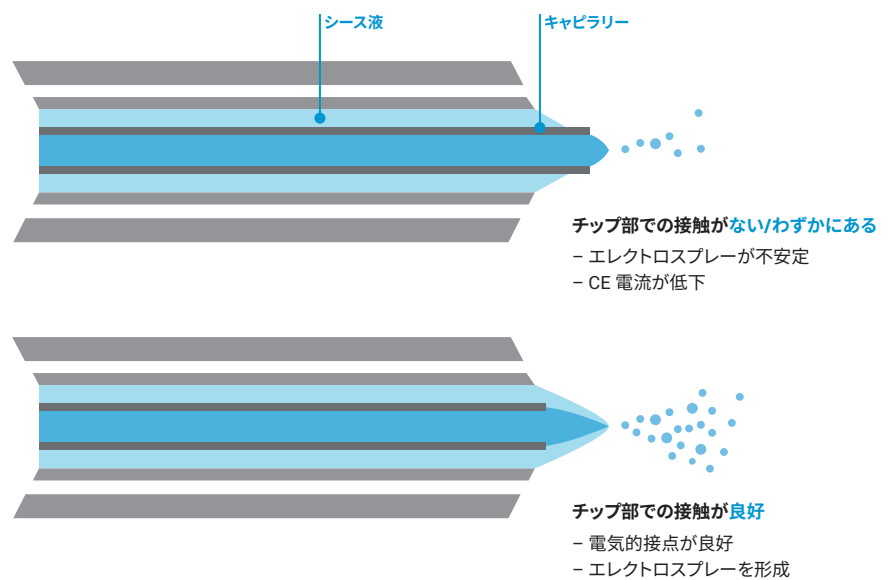


図 62. チューブ中央にある CE キャピラリー、チューブ中間にあるスプレーニードルとシース溶液、チューブ外側にあるネブライザガスタンチューブ

## 20.2

### MS 信号に関連する症状

#### サンプル注入後に CE 電流が停止する

原因	解決方法
ネブライザガス流による吸引効果によって、BGE 内に液体ギャップが形成されています。	注入時間中のネブライザガス圧力が低い値になるようタイムプログラムします。内径が小さく (内径 50 $\mu\text{m}$ を推奨) 長い分離キャピラリーを使用します。
サンプル導入シーケンス中にキャピラリー出口方向へのサイフォン効果によって、液体ギャップが形成されています。	注入口バイアルの高さレベルとスプレーヤーの高さレベルをチェックします。 <a href="#">セクション 11.1「CE および MS 機器のレベリング」</a> を参照してください。

#### ベースライン MS シグナル (TIE) の変動が大きい

原因	解決方法
シース溶媒流量が不安定で変動しているか、脱気が不十分です。	推奨されているアイソクラティックポンプとオンラインデガッサを使用します。
CE キャピラリーのポリイミドが膨張しているか外れています (図 63 を参照)。	BGE やシース溶媒で、高濃度 (>50 %) のアセトニトリルを使用しないようにします。アジレント標準 CE キャピラリーを使用するか、CE キャピラリーの末端のポリイミドを除去します。

#### ピーク形状が歪んでいる

原因	解決方法
分離キャピラリーのインレットチップまたはアウトレットチップが破損しているか、平らではありません。	キャピラリーの末端をカッターでカットするか ( <a href="#">セクション 14.1「キャピラリーの準備」</a> を参照)、新しいキャピラリーを使用します。新しいキャピラリーは適切に前処理します。
シース溶媒とバックグラウンド電解液が対応していません。沈殿物またはエマルジョンが形成されています。	BGE とシース溶媒の混合状態をチェックします。
スプレーニードルが腐食しています (陽イオンキャピラリーを使用しており、スプレーニードルがアノードである場合のみ)。	ステンレススプレーニードルをプラチナスプレーニードル (部品番号 G7100-60041) に交換します。

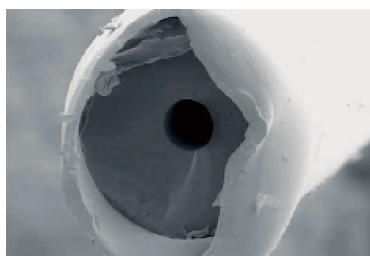


図 63. CE キャピラリーのポリイミドが膨張しているか外れている

## 泳動時間が短くピーク幅が広い

原因	解決方法
キャピラリー出口方向への液体の流れがあります。	注入口バイアルの高さレベルとスプレーヤーの高さレベルをチェックして、サイフォン効果が発生しないようにします。セクション 11.1「CE および MS 機器のレベルリング」を参照してください。 ネプライザガスの圧力を下げて、吸引効果が発生しないようにします。セクション 21.1「吸引効果の測定と低減」を参照してください。

## 泳動時間の再現性の低下または変動

原因	解決方法
ラボ内の温度変化が、CE 分離キャピラリーの温度制御されていない部分に影響しています。	必ず CE スプレーヤーキットの PTFE チューブのカバーを使用するか、エアコンで温度調整されたラボで使用してください。
注入口バイアル内の BGE が変化しています。	3～5 回注入した後に注入口バイアルの中身を補充するか、新しい BGE バイアルを使用します。

## ピーク高の再現性が低い (TIE)

原因	解決方法
イオン化効率が安定していません。	内部標準として、溶質の安定同位体標準物質を使用します。
CE 装置の注入精度が低下しています。 CE キャピラリーの注入口側が正しくカットされていないか破損しているため、電界変化が発生しています。	内部標準を使用します。

## ピークがない、または小さい

原因	解決方法
分離キャピラリーの内壁に溶質が吸着しています。	DAD でピークと分離の存在を確認します。

## ブランクランでピークが見られる (キャリアオーバー)

原因	解決方法
動電的に注入すると、バイアル中のサンプル溶液のレベルが電極に達します。サンプル溶液が CE キャピラリーと電極内壁の間の環状空間に入ることがあります。残りのサンプル溶液が BGE/次のサンプルバイアルに入り、次の注入で導入されます。	サンプルバイアル中のサンプル溶媒のレベルが、常に電極の端より下にあることを確認してください。 圧力注入します。短い電極 (部品番号 G7100-60033) と圧力注入を使用して、電極がサンプルに触れないようにします。 サンプル注入シーケンスではインレット電極の洗浄コマンドを使用します。7100 CE システムのユーザーマニュアル (部品番号 G7100-90000) を参照してください。

## 20.3

### 症状 - ESI 電流

#### ESI 電流が安定しないか低すぎる

原因	解決方法
ドライガスの流量が多すぎます。	ドライガスの流量をできるだけ減らします。

#### バックグラウンド MS 電流が大きすぎる

原因	解決方法
スプレーノードル、CE キャピラリー、またはシース液ポンプが汚れています。	キャピラリーをフラッシュするか、スプレーノードルまたはシース液ポンプをクリーニングします（スプレーノードルの点検の詳細については、 <a href="#">ユーザーマニュアル (部品番号 G1960-90470)</a> を参照してください）。
BGE またはシース溶媒が汚れています。	システムのすべての部品は、最大限きれいな状態でお使いください。

## 21 メソッド開発に関する詳細情報

### 21.1

#### 吸引効果の測定と低減

三重管構造のスプレーヤーを用いた CE/MS 中に CE キャピラリー内で流体力学的な流れが発生することが、複数のグループによって報告されています (セクション 9.9 「動作パラメータ - ネブライザガス圧、ドライガス温度、流量」を参照)。この流れは、CE キャピラリーの出口が低圧状態になるために発生します。ネブライザガス流とシース溶媒の速度が、キャピラリー内を移動する溶媒の速度を上回るためです。このため、注入バイアル内の液体にかかる圧力が出口側より高くなります。この現象はベルヌーイ効果と呼ばれます。

前述のとおり、CE キャピラリー内で液体の流れが発生することは望ましくありません。放物線流速プロファイルが形成され、溶質ゾーンが広がるためです。また、この流れが EOF と電気泳動溶質の速度に加わり、分離時間が短くなります。図 64 の例は、この効果を示しています<sup>37</sup>。

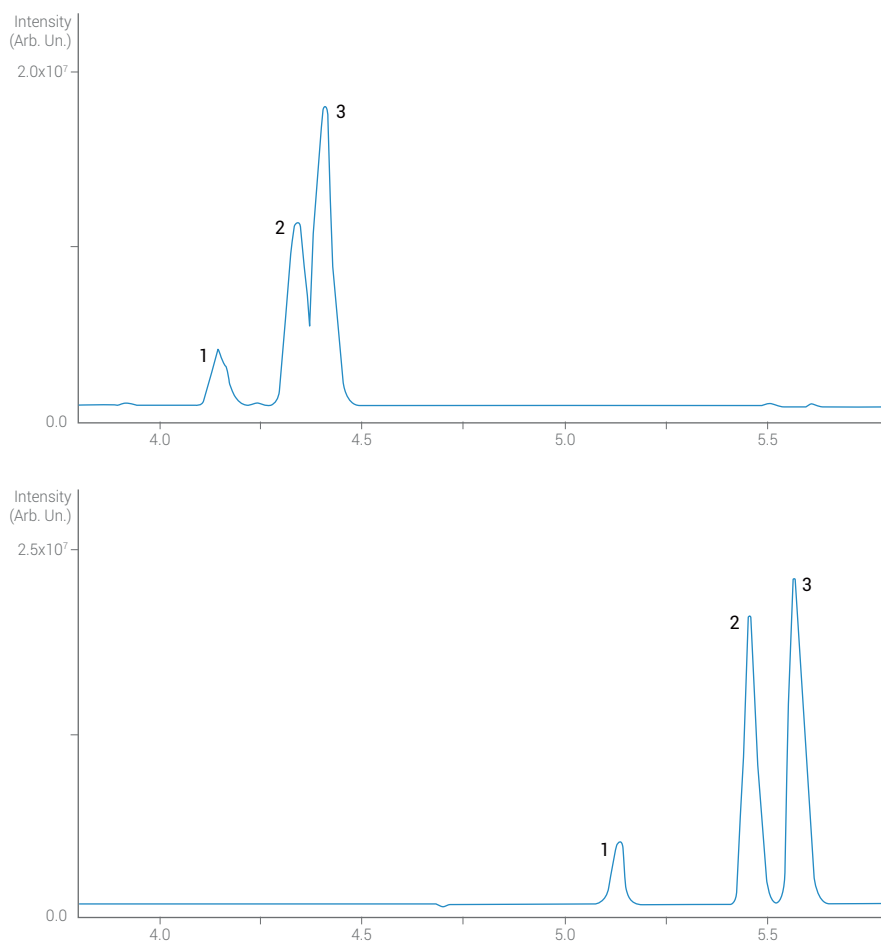


図 64. PB-PVS-コーティングされたキャピラリーを用いた、50 µg/mL のエンケファリンテスト混合物の CE/MS 分離。上のエレクトロフェログラムは、注入バイアルに負圧をかけなかった場合の結果です。下のエレクトロフェログラムは、注入バイアルに 50 mbar の圧力をかけた場合の結果です (参考文献 37 から許可を受けて引用)。

図 64 は、PB-PVS-コーティングされたキャピラリーと 500 mM ギ酸の BGE (pH 2.5) を用いた、エンケファリンテスト混合物 (GGFM-NH<sub>2</sub> (1)、YGGFL (2)、YAGFM (3) を 50 µg/mL で混合) の CE/MS 分離の結果を示しています。上のトレース A は、注入口バイアルで負の (補償) 圧力をかけない場合の結果です。下のトレース B は、注入口バイアルで -50 mbar の圧力をかけた場合の結果です。これらの結果から、泳動時間が延びるだけでなく、分離効果が向上することが明確にわかります。これは、液体の流れによるバンド拡張への悪影響が軽減されるためです。3 つのピークの段数は 15,000 ~ 50,000 から 100,000 ~ 200,000 に増えています。

次に、補償圧力の大きさを決める簡単な手順を示します。CE/MS 中にこの圧力を注入口側にかけ、液体の流れの影響を効果的に抑制する必要があります。この実験は、CE 分離の電場をかけずに実行します。このため、溶質の EOF も電気泳動移動度もありません。分離されないため、単一マーカ物質を含むサンプルの使用が必要です。この手順を、次の式と図 65 に示します。

マーカ速度は次の式で求めます。

$$u_o = \frac{L_{tot}}{t_{mig}}$$

圧力 ( $\Delta P$ ) が注入口バイアルにかかった場合に発生する流れは、次の式で求めます。

$$u_p = \frac{\Delta P \cdot K_d}{\eta \cdot L_{tot}}$$

流れ全体の速度は、出口側の抑止圧による液体の流れ ( $u_o$ ) と注入口側の加圧の合計です。

$$\frac{L_{tot}}{t_{mig}} = u_o + u_p = u_o + \frac{\Delta P \cdot K_d}{\eta \cdot L_{tot}}$$

3 回の個々の分析において、マーカ速度の泳動時間は注入口バイアルにかかる定圧の関数として測定されます。泳動時間の逆数と注入口バイアルにかかる圧力の関係を図に示します。

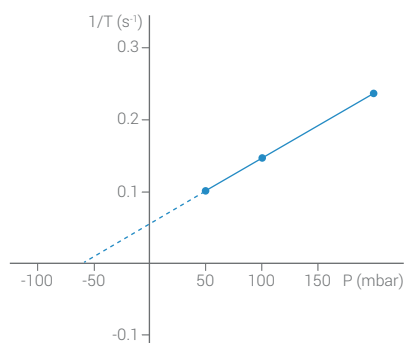


図 65. EOF マーカ速度の泳動時間と注入口バイアルへの圧力の関係を示すプロット

X 軸と負圧値 (CE/MS スプレーヤーの出口側の抑止圧と平衡する値) で交差する直線となります。この圧力の正確な値は、直線回帰と切片の計算によって得ることができます。この例では、出口側の負圧との平衡に約 -50 mbar が必要です。

## 21.2

### シース液の組成の影響

CE 中に、BGE のサンプルイオンと共イオンがキャピラリーのスプレーヤーチップから放出されます。また同時に、シース溶媒の対イオンがキャピラリーに入り、注入側に移動すると同時に、BGE イオンが注入側側のキャピラリーに入ります<sup>38</sup>。

EOF が少ないかまったくなく、BGE にシース溶媒とは異なる対イオンが含まれる場合は、キャピラリー内に移動イオン境界ができる可能性があります。このプロセスのしくみを図 66 に示します。

これらのイオンの個々の電気泳動移動性と  $pK_a$  値によって、元の BGE とバッファの間に (シース溶媒の対イオンによる対イオンの交換によって) 形成される境界の明確さが変わります。また、移動イオン境界による新しい BGE の pH と伝導率が、元の BGE と大幅に異なる場合があります。この BGE の差が、バンド形状の歪みの原因となります。

この現象を防ぐには、バッファおよびシース内の対イオンの移動度と  $pK_a$  を一致させます。これらは同じであることが理想的です。注入側と出口側の間で、少し圧力差を付けることができます。例えば、前述の方法やベルヌーイ効果を用いて出口側の圧力を下げます。または、注入側に圧力をかけると、移動境界の速度を超える流体力学的な流れの速度を生み出すことができます。または、EOF を生成する使用条件を検討します。

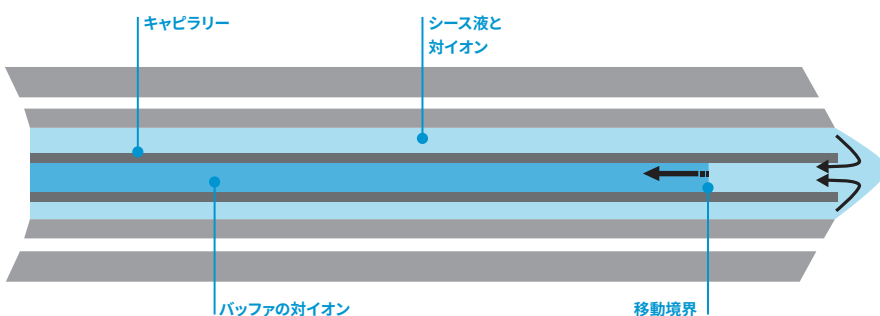


図 66. BGE とシース溶媒の対イオンは異なる想定されるため、シース溶媒の対イオンが CE キャピラリーに伝播する

## 22 関連情報

### 22.1

#### CE/MS スプレーヤーキットの 組み立て

一般的に、CE-MS スプレーヤーのメンテナンスはほぼ不要です。ただし問題が発生した場合などに、部品交換が必要となる可能性があります。図 67 と表 10 の部品は、お客様が交換できます。

表 10. メンテナンスまたは修理用の部品

アイテム番号	品名	部品番号
1	スプレーヤー本体	部品番号なし
2	スプレーヤーヘッド	部品番号なし
3a、3b	ガスケット	G1607-20030
4	O-リング	0905-1022
5	スプレーニードル	G1607-60041
6	スプリング	5022-2140
7	ネジ本体	G1607-20029*
8a、8b	シール固定ネジ	G1607-20022*
9	スプレーヤー用保護チューブ	0890-0581
表示なし	PEEK フィッティング、フェラルキャピラリー、ネプライザガス	0100-1543
表示なし	PEEK フェラルキャピラリー	5022-2141

\* 交換については、アジレントのサービス担当者にお問い合わせください。

#### スプレーニードルの交換 (アイテム 5)

1. ネプライザガス、シース液チューブ、CE/MS キャピラリーをスプレーヤーから取り外します。
2. CE/MS スプレーヤーを MSD から取り外し、純正の PTFE チューブでスプレーヤーを保護します。
4. 2本の本体ネジを外します (7)。付属のスプリング (6) はなくさないようにします。  
図 68A を参照してください。
5. スプレーヤーヘッド (2) を回してスプレーヤー本体 (1) から外します。図 68B を参照してください。
6. スプレーヤー本体のシール固定ネジ (8b) を外します。
7. 問題のあるスプレーニードル (5) を取り外します。
8. 新しいスプレーニードルの上に新しいガスケット (3b) をスライドさせます。
9. スプレーヤー本体に新しいニードルを慎重に挿入します。
10. シール固定ネジ (8b) を再度挿入します。ただし、締め過ぎないようにします。
11. スプレーヤーヘッド (2) を回して、スプレーヤー本体 (1) に取り付けます。
12. スプレーニードルがスプレーヤーチップから約 0.1 ~ 0.2 mm (直径の約 1/3) 突出しているかどうかを確認します (図 71. 突出した ESI ニードル、良い例 (A)、悪い例 (B、C))。ネプライザ調整台 (部品番号 G1960-67470) と対応する携帯型顕微鏡 (部品番号 G1960-67470) を使用します。これらは Agilent MSD アクセサリキットの一部です。必要に応じて、後述の方法でスプレーニードルを再調整します。

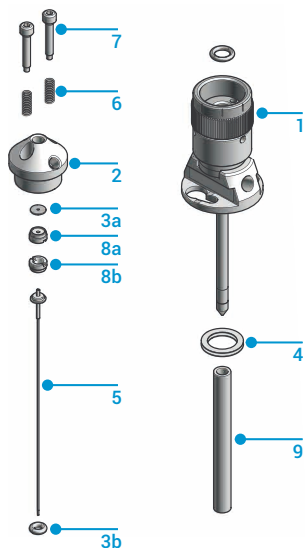


図 67. Agilent CE/MS スプレーヤー

13. 接続部を慎重に組み立て、前述の方法でキャピラリーを調整し、MSD に再度取り付けます。
14. テストサンプルを使用して、正しく動作することを確認します。
15. シース液によって、新しく挿入した素材から表面の汚染物質を洗浄できるようにします。

シール固定ネジを締め過ぎると、ESI ニードルに張力がかかり、スプレーヤーを通るニードルの経路が曲がる可能性があります。このため、ニードルが出るときに出口の縁に接触する可能性があります。シール固定ネジを締め過ぎないでください。ネジをゆるめ、ニードルを回し、ニードルが縁に接触する場合は慎重に締めなおします。新しい Agilent CE/MS スプレーヤーは、事前調整されています。本体部品の六角ネジをゆるめないでください。

### スプレーニードルの再調整

新しい Agilent CE/MS スプレーヤーは、事前調整されています。スプレーニードルはスプレーヤーチップから約 0.1 ~ 0.2 mm 突出させます。これが、最大限の感度とベースライン安定性を発揮できる設定です。通常の使用では、スプレーニードルの再調整は不要です。

スプレーニードルの位置が上記の設定と異なる場合にのみ、CE/MS スプレーヤーを再調整してください。

1. 調整ネジを、止まるまで反時計回り (+ 方向) に回します。
2. 下の調整リングの上の 3 本の六角ネジを、半回転分ゆるめます。  
下の調整リングは金属製で、表面は平らです。
3. その後の調整手順の間に、スプレーヤーヘッドと本体部品を一緒に押してバックラッシュを取り外します (図 70)。
4. スプレーニードルがスプレーヤーチップと同じ高さになるまで、下の調整リングを反時計回りに回します。
5. 下の調整ネジを、時計回りに 1/4 回転させます。
6. 下の調整リングの上の 3 本の六角ネジを締めます。スプレーニードルがスプレーヤーチップから約 0.1 ~ 0.2 mm (直径の約 1/3) 突出していることを確認します。図 71 を参照してください。この手順には、ネプライザ調整台 (部品番号 G1960-67470) と対応する携帯型顕微鏡 (部品番号 G1960-67470) を使用します。これらは Agilent MSD アクセサリキットの一部です。

必要に応じて、スプレーニードルを再調整します。通常の調整値は 0.1 ~ 0.2 mm ですが、最適な値はスプレーヤーのその他の条件や個々の ESI スプレーヤーによって異なる場合があります。ベースラインが正常でなかったり、スパッタリング効果が見られたりする場合は、0.3 mm に設定してみてください。

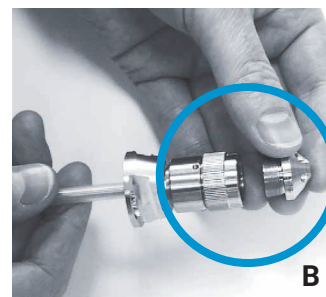
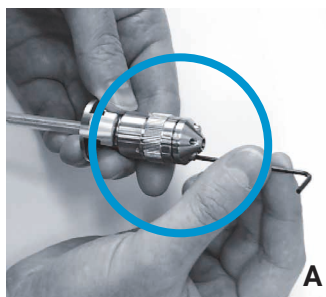


図 68. スプレーヤー本体からのスプレーヤーヘッドの取り外し



図 69. スプレーヤー本体のガスケットへのアクセス



図 70. ニードル調整中のスプレーヤーの処理

## 22.2

### スプレーヤーのメンテナンス

一般的に、CE/MS スプレーヤーのメンテナンスはほぼ不要です。ただし問題が発生した場合などに、部品交換が必要となる可能性があります。問題がスプレーヤーに関連する可能性がある場合は、次の方法をお試しください。

- スプレーヤーの再調整。例えば内部ニードル、キャピラリー、適用流量など
- 再調整後のクリーニング
- ニードルやガスケットなどのスプレーヤー部品の交換

交換、クリーニング、調整の手順については、以下または前の各章の説明を参照してください。問題の根本原因を特定するには、第 20 章「トラブルシューティング」を参照してください。表 11 の部品は、メンテナンスで交換できます。

表 11. メンテナンスまたは修理用の部品 (図 72 を参照)。

アイテム番号	品名	部品番号
1	スプレーヤー本体	部品番号なし
2	スプレーヤーヘッド	部品番号なし
3a、3b	ガスケット	G1607-20030
4	O-リング	0905-1022
5	スプレーニードル、ステンレス	G1607-60041
6	スプリング	5022-2140
7	ネジ本体	G1607-20029*
8a、8b	シール固定ネジ	G1607-20022*
9	スプレー用保護チューブ	0890-0581

表示なし	PEEK フィッティング、フェラルキャピラリー、ネプライザガス	0100-1543
表示なし	PEEK フェラルキャピラリー	5022-2141
5*	プラチナエレクトロスプレーニードル	G7100-60041

\* 交換については、アジレントのサービス担当者にお問い合わせください。

## CE/MS 用プラチナエレクトロスプレーニードルアセンブリ

このプラチナニードル（部品番号 G7100-60041）は、交換部品として CE エレクトロスプレーインタフェース (ESI) スプレーヤー（部品番号 G1607-60002）に組み込まれています。これは、材質的には標準の（ステンレス）ESI スプレーニードル（部品番号 G1607-60041）と同じですが、物理的寸法が少し異なります。このため、標準ニードルよりもガスと液体の流量を細かく調整する必要があります。プラチナ ESI スプレーニードルは、特に逆 CE 極性のアプリケーションで高い堅牢性と長寿命性を発揮します。逆極性によってキャピラリー出口で酸化プロセスが発生し、この腐食金属イオンが遊離すると、分析に悪影響が出る場合があります（メタボロミクスの陰イオン検出など）。

## スプレーヤーガスケットの交換

リークが生じるガスケット（アイテム 3a、3b、部品番号 G1607-20030）では、MSD シグナルが不安定になることがあります。シース液の流量が 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  を超えると、ガスケットが破損する可能性があります。ガスケットセットは Agilent CE/MS スプレーヤーキットに付属しています。個別に注文することもできます。ガスケット交換に必要な部品は次のとおりです。

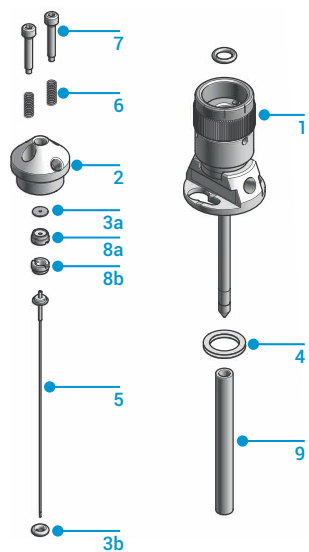


図 71. Agilent CE/MS スプレーヤー

- 六角レンチ 2 mm
  - 六角レンチ 1.3 mm
  - ガスケット（部品番号 G1607-20030）
1. ネプライザガス、シース液チューブ、CE/MS キャピラリーをスプレーヤーから取り外します。
  2. MS から CE/MS スプレーヤーを取り外します。
  3. スプレーヤーチップの上に保護チューブをスライドさせます。
  4. 2本の本体ネジを外します（7）。付属のスプリング（6）をなくさないように注意してください。
  5. スプレーヤーヘッド（2）を回してスプレーヤー本体（1）から外します。
  6. 特殊なネジドライバ（5022-2142）を使用して、スプレーヤーヘッドの下部のシール固定ネジ（8a）を外します。ガスケットとここに詰まっている粒子を除去します。
  7. ガスケット（3a）を新しいものと交換します。
  8. シール固定ネジ（8a）を挿入します。
  9. スプレーヤーヘッド（2）を回して、スプレーヤー本体（1）に取り付けます。
  10. 接続部を慎重に組み立て、前述の方法でキャピラリーを調整し、MS に再度取り付けます。
  11. テストサンプルを使用して、正しく動作することを確認します。
  12. シース液によって、新しく挿入した素材から表面の汚染物質を洗浄できるようにします。

## スプレーニードルの交換

顕微鏡を使って、スプレーヤーチップが腐食していないかどうか定期的にチェックします。ネブライザ調整台（部品番号 G1960-67470）と対応する携帯型顕微鏡（部品番号 G1960-67470）を使用します。これらは MS のアクセサリキットの一部です。腐食は、アプリケーション中の酸化プロセスによって発生する場合があります。また、MS ドライガスによる熱損傷が原因の場合もあります。

また、シースフローを増やしてスプレーヤーチップを検査することもできます。ポンプを 5 mL/min に設定して、シースフローを 50  $\mu$ L/min にします。このフローでは、スプレーコーンを確認できます。コーン是对称である必要があります。チップが腐食していたり、コーンが非対称であったりする場合は、スプレーニードル (5) の交換が必要です。

シース液が流れていないと、MS ドライガスによってスプレーニードルの熱損傷が発生する可能性があります。シース液がなく、ドライガスが高温の状態では機器を放置しないでください。この場合は、ESI スプレーヤーをイオンソースから取り外してください。

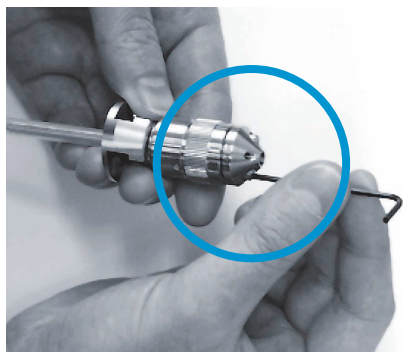


図 72. スプレーヤーヘッドをゆるめる

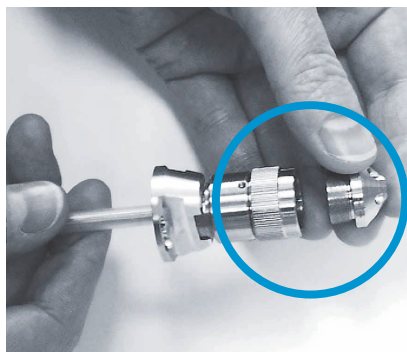


図 73. スプレーヤーヘッドの取り外し

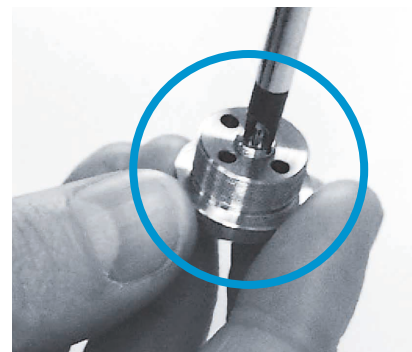


図 74. スプレーヤーヘッドのガスケットへのアクセス

## 22.3

### バッファとテストサンプルの調製

次の溶液を準備する必要があります。CE 用のすべての溶媒は、使用前に 0.2  $\mu$ m フィルタでろ過する必要があります。

- 1 N 水酸化ナトリウム (キャピラリーの初期コンディショニング)
- 1 mL の水 (キャピラリーの初期コンディショニング)
- 10 mM 酢酸アンモニウム pH 6.9 (使用するバッファ)
- 5 mM 酢酸アンモニウムの 50 % メタノール溶液 (シース液、週 1 回以上新しく調製)
- 1 mg/mL のキニーネ硫酸塩水和物の水溶液 (テストサンプル、使用前に新しく調製)

### テストサンプル

1. テストサンプル 1 mg を計量し、2 mL のエッペンドルフチューブに入れます。
2. 1 mL の水を添加します。
3. 化合物が完全に溶けるまで攪拌します（バイアルをミキサーに 30 分間、または超音波に 15 分間かけます）。
4. テスト溶液をサンプルバイアルに入れます（ガラスバイアルに 1 mL、またはポリプロピレン (PP) バイアルに 500  $\mu$ L、PPバイアル（サンプル用）に 20  $\mu$ L）。

### 初期コンディショニング用の溶媒

1. 1 N 水酸化ナトリウムを入れたバイアルを1本用意します（PP バイアルに 300  $\mu$ L）。
2. 水を入れたバイアルを1本用意します（ガラスバイアルに 1 mL、または PP バイアルに 500  $\mu$ L）。

### 使用するバッファ

1. 5 mL アンブル 1 本の内容物（20:80 v:v メタノール/水に 1.9 g の酢酸アンモニウムを含む）を 245 mL の水で希釈します。この希釈によって、100 mM 酢酸アンモニウム pH 6.9、0.4 % (v:v) メタノールの原液ができます。
2. 原液を 1:10 に希釈します。
3. 2 本のバイアルを使用するバッファで調整します（ガラスバイアルに 1 mL、または PP バイアルに 500  $\mu$ L）。

### シース液

1. 225 mL の CE グレードの水と 250 mL のメタノールを混合します。
2. 25 mL の 100 mM 酢酸アンモニウム原液を添加します。
3. 十分に攪拌します。
4. ポンプシステムの溶媒ボトル A にシース液を入れます。パージを行い、シース液を送液できる用意をします。

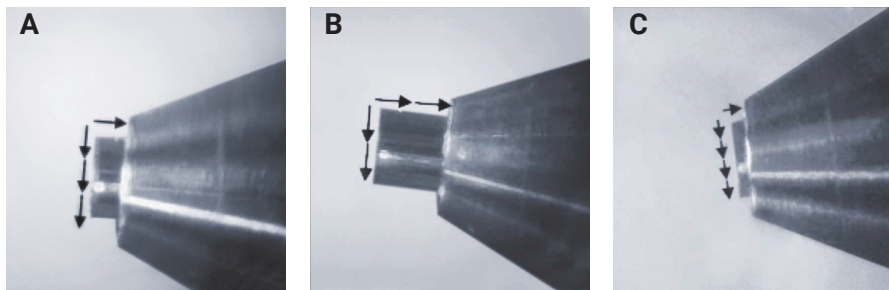


図 75. 突出した ESI ニードル、良い例 (A)、悪い例 (B、C)

## 23 参考文献

- 1 P. Arpino, Combined liquid chromatography mass spectrometry, Part 111, Applications of Thermospray, *Mass Spectrometry Reviews*, **1992**, 11, 3.
- 2 M.L.Vestal, Thermospray liquid chromatographic interface for magnetic mass spectrometers, *Analytical Chemistry*, **1984**, 56, 2590.
- 3 R.F.Browner et al., Performance of an improved monodisperse aerosol generation interface for liquid chromatography/mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1988**, 60, 489.
- 4 M. Yamashita, J.B.Fenn, *Journal of Physical Chemistry*, **1984**, 56, 2590.
- 5 M.L.Aleksandrov et al., *Bioorg Khim*, **1984**, 10, 710–712.
- 6 A.P.Bruins, Th.R.Covey, and J.D. Henion, Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1987**, 59, 2642.
- 7 R.D.Smith, C.J.Barinaga, H.R.Udseth, Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1988**, 60, 1948.
- 8 T. Wachs, R.L.Sheppard, J. Henion, Design and applications of a self-aligning liquid junction-electrospray interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B, Biomedical Applications*, **1996**, 685, 335.
- 9 J.D. Henion, A.V.Mordehai, J.Cai, Quantitative capillary electrophoresis-ion spray mass spectrometry on a benchtop ion trap for the determination of isoquinoline alkaloids, *Analytical Chemistry*, **1994**, 66, 2103.
- 10 J. Fred Banks Jr., Optimization of conditions for the analysis of a peptide mixture and a tryptic digest of cytochrome c by capillary electrophoresis-electrospray-ionization mass spectrometry with an improved liquid-sheath probe, *Journal of Chromatography A*, **1995**, 712, 245.
- 11 J. Fred Banks Jr., Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray/mass spectrometry, *Electrophoresis*, **1997**, 18, 2255.
- 12 C. Simo, V. Garcia-Canas, A. Cifuentes, Chiral CE-MS, *Electrophoresis*, **2010**, 31, 1442.
- 13 C.A.Lucy, A.M. MacDonald, M.D. Gulcev, Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1184, 81–105.
- 14 C. Huhn, R. Ramautar, M. Wuhrer, G.W.Somsen, Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 396, 297–314.
- 15 H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa, Stable capillary coating with successive multiple ionic polymer layers, *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, 2254–2260.
- 16 M.U.Musheev, Y. Filiptsev, S.N. Krylov, Temperature Difference between the Cooled and the Noncooled Parts of an Electrolyte in Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.*, **2010**, 82 (20) , 8692–8695. T. Hankemeier and R. Ramautar, private communication.
- 17 <http://www.analis.be> (accessed 1.9.2018)
- 18 I. Kohler, M. Augsburg, S. Rudaz, J. Schappler, New insights in carbohydrate-deficient transferrin analysis with capillary electrophoresis–mass spectrometry, *Forensic Science Int.*, **2014**, 243, 14–22.
- 19 T. Soga et al., Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **2009**, 81 6165–6174.
- 20 M. Breadmore, C. Sanger-van de Grient, In-Capillary Sample Concentration in CE, *LCGC North America*, **2014**, 32 (3) .
- 21 S. Wang, P. Yang, Y. Cheng, Analysis of tetracycline residues in bovine milk by CE-MS with field-amplified sample stacking, *Electrophoresis*, **2007**, 28, 4173–4179.

- 22 Md.N. Hasan et al., Chromatographic determination of solubilities in superheated water. *Journal of Separation Science*, **2010**, 33, 3701–3709.
- 23 P. Meng et al., pH-mediated stacking in capillary electrophoresis for analysis of opiates in saliva, *Analytical Methods*, **2012**, 4, 3695.
- 24 A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, Recent advances of transient isotachopheresis-capillary electrophoresis in the analysis of small ions from high-conductivity matrices, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 323.
- 25 Z.A. AlOthman et al., Single-drop microextraction as a powerful pretreatment tool for capillary electrophoresis: A review, *Analytica Chimica Acta*, **2012**, 739, 14.
- 26 M. Pelzing, C. Neusüss, Separation techniques hyphenated to electrospray-tandem mass spectrometry in proteomics: capillary electrophoresis versus nanoliquid chromatography, *Electrophoresis*, **2005**, 26, 2717.
- 27 J. Schappler et al., Multiple injection technique for the determination and quantitation of insulin formulations by capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **2010**, 1217, 804.
- 28 K. Markides et al., Phosphate buffers in capillary electrophoresis/mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization and electrospray ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2003**, 17, 2267.
- 29 G.J. de Jong et al., Atmospheric pressure photoionization for enhanced compatibility in on-line micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **2005**, 77, 5277.
- 30 G.J. de Jong et al., On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry using dopant-assisted atmospheric pressure photoionization: setup and system performance, *Electrophoresis*, **2005**, 26, 146.
- 31 J. Schappler et al., Coupling CE with atmospheric pressure photoionization MS for pharmaceutical basic compounds: optimization of operating parameters, *Electrophoresis*, **2007**, 28, 3078.
- 32 G.J. de Jong et al., Capillary Electrophoresis-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry Using an Orthogonal Interface: Set-Up and System Parameters, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2009**, 20, 1311.
- 33 G. Bonvin et al., In-spray supercharging of intact proteins by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry using sheath liquid interface. *Analytica Chimica Acta*, **2014**, 813, 97.
- 34 P. Gareil et al., A new insight into suction and dilution effects in capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry via an electrospray ionization interface, Part I – Suction effect, *Electrophoresis*, **2008**, 29, 1957.
- 35 P. Gareil et al., New insight into suction and dilution effects in CE coupled to MS via an ESI interface, Part II – Dilution effect, *Electrophoresis*, **2009**, 30, 1692.
- 36 C.L. do Lago et al., Reviews 2014, A spectrum of separation approaches, analytical methodologies and important applications, *Electrophoresis*, **2014**, 35, 1.
- 37 G.J. de Jong et al., Efficient and highly reproducible capillary electrophoresis-mass spectrometry of peptides using Polybrene-poly (vinyl sulfonate)-coated capillaries, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 2091.
- 38 F. Foret et al., Liquid Sheath Effects on the Separation of Proteins in Capillary Electrophoresis/ Electrospray Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1994**, 66, 4450.



## 詳細

アジレントの Web サイトでは、CE と CE/MS に関する豊富な情報（アプリケーションノート、入門書、技術概要、ユーザーマニュアルなど）をご用意しています。  
以下のリンクから、ご希望の分野に関する発行物をダウンロードしてください。

Application Finder: [www.agilent.com/en/promotions/applicationfinder](http://www.agilent.com/en/promotions/applicationfinder)

製品とリソース: [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Printed in Japan, February 1, 2019  
5994-0112JAJP